

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1969

1133

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE
(DIPLOME D'ÉTAT)

par

Patrice, Jean-Marie MANNONI

Né le 2 Janvier 1941 à PARIS

Dossier N° 3487 K

Présentée et soutenue publiquement le :

APPLICATION DE MÉTHODES
D'ANALYSES AUTOMATIQUES
A L'IMMUNO-HÉMATOLOGIE
ET A LA TRANSFUSION SANGUINE

Président : Professeur Robert ANDRÉ

Médecin des Hôpitaux de Paris

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

Directeur du Centre Départemental de Transfusion Sanguine de Paris

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1969

N°

II II II II II

POUR LE

II DOCTORAT EN II II MEDICINE
(diplôme d'Etat)

PAR

Patrice MANNONI

né le 2 janvier 1941 à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le

APPLICATION DE METHODES D'ANALYSES AUTOMATIQUES A L'IMMUNO-
HEMATOLOGIE ET A LA TRANSFUSION SANGUINE

Président : M. Robert ANDRE, Professeur

A mon Père,

avec toute ma reconnaissance pour la
médecine qu'il m'a fait connaître et
aimer.



A Claude.

A mon Père,

avec toute ma reconnaissance pour la
médecine qu'il m'a fait connaître et
aimer.



A Claude.

A mon Maître et Président de Thèse
Monsieur le Professeur Robert ANDRE

En témoignage de ma gratitude
et de ma profonde admiration.

A Monsieur le Professeur Agrégé Charles SALMON
qui m'a confié ce travail,
et orienté vers ces techniques
nouvelles.

En témoignage de ma profonde
reconnaissance pour l'enseigne-
ment qu'il m'a prodigué, et
pour l'accueil qu'il m'a réservé
dans son laboratoire.
Qu'il trouve ici mon sincère
remerciement.

A Monsieur le Professeur Bernard DREYFUS

En témoignage de mon sincère
attachement.

A Messieurs les Docteurs

Alain GERBAL
Jean-Claude HOMBERG
Henri ROCHANT
Jeanine CARTRON
Anne-Marie WEINFELD
Doris CHICOT
Anne-Marie JULIEN
Jacques YVART

A Mademoiselle Christine BRACQ

et tous les membres du Laboratoire
d'Immuno-Hématologie Appliquée à la
Transfusion Sanguine, pour l'aide
qu'elles m'ont apportée dans ce
travail.

A tout le Personnel du Service d'Immunologie et du
Centre Départemental de Transfusion
Sanguine de Paris.

A mes maîtres d'Externat

Monsieur le Professeur J.Y. LONGUET
Monsieur le Professeur J. LEREBOLLET
Monsieur le Professeur E. AZERAD
Monsieur le Professeur R. VIALATTE

A mes Maîtres d'Internat

Monsieur le Professeur E. BERNARD
Monsieur le Professeur P. ALBAHARY
Monsieur le Professeur Ch. SORS
Monsieur le Professeur R. ANDRE

Ce travail a été effectué dans le laboratoire d'Immuno-
Hématologie Appliquée à la Transfusion Sanguine :

Service du Professeur Agrégé Charles SALMON

Centre Départemental de Transfusion Sanguine de Paris

Directeur : Professeur R.ANDRE

INTRODUCTION

La mise au point de nouvelles techniques et méthodologies automatiques ou semi-automatiques a permis de modifier de nombreux principes d'analyses chimiques notamment dans leurs applications à la biologie humaine et à la biochimie médicale.

Non seulement, elles permettent d'accroître le nombre d'examen, mais aussi augmentent la précision et la sensibilité des méthodes.

De telles techniques sont maintenant utilisables dans l'étude de certains problèmes immunologiques, notamment en Immuno-Hématologie, et dans son application à la Transfusion Sanguine.

Nous voudrions rapporter ici les principes et les méthodes disponibles à l'heure actuelle, ainsi que l'expérimentation qui en est faite depuis 18 mois au laboratoire d'Immuno-Hématologie appliquée à la Transfusion Sanguine, du Centre Départemental de Transfusion Sanguine de Paris.

Cette étude comportera :

1°/ Principes, Méthodes et Description de l'appareillage utilisé (Auto Analyzer Technicon)

2°/ Application à la détermination des antigènes de groupes sanguins :

- soit en vue de la détermination des phénotypes érythrocytaires courants, dans un but transfusionnel.

- soit pour des buts particuliers, comme la recherche de sujets possédant un antigène de groupe sanguin particulièrement rare, ou au contraire de sujets démunis d'un antigène normalement présent chez tous les individus.

3°/ Application au dépistage et à l'identification d'anticorps anti-érythrocytaires.

Cette partie sera particulièrement développée, notamment en ce qui concerne l'identification automatique de la spécificité de ces anticorps. Elle constitue à notre connaissance une expérimentation unique.

4°/ Autres applications possibles en Immuno-Hématologie :

- Réaction de déviation du Complément
- Dépistage d'anticorps anti-Gm.

5°/ Conclusion et Perspectives d'avenir.

CHAPITRE I

PRINCIPES, METHODES ET DESCRIPTION DE L'APPAREILLAGE UTILISE

(AUTO ANALYZER TECHNIQUE)

Depuis ces dernières années, les laboratoires de biologie ont vu croître de manière très importante, la demande d'analyses de routine ou spécialisées.

C'est en premier lieu en chimie analytique et en biochimie médicale que furent effectuées les premiers essais d'automatisation de laboratoire. Depuis plus de 10 ans, des techniques automatiques sont au point pour la détermination des paramètres biologiques, tels que l'urée, la glycémie, le dosage du sodium, du potassium, des bicarbonates.

Le champ des investigations ne cessa alors de s'accroître. L'apparition de ces techniques fut surtout la conséquence de l'introduction d'un appareillage automatique "l'Auto Analyzer Technicon". Actuellement, grâce à cet appareil, des méthodologies automatiques sont utilisables, non seulement en chimie, mais aussi en hormonologie, enzymologie, et plus récemment en hématologie.

Il est certain que de tels progrès devaient intéresser les Centres de Transfusion Sanguine, qui ont à faire de nombreux examens immunologiques soit sur les donneurs de sang, soit sur des malades :

- 1) Détermination des groupes sanguins standard et des phénotypes plus complets.
- 2) Recherche d'allo-anticorps anti-érythrocytes dans le cadre :
 - soit de la surveillance des malades transfusés
 - soit de l'allo-immunisation foeto-maternelle.
- 3) Certains centres peuvent aussi avoir à effectuer d'autres examens :
 - détection et identification d'anticorps anti-leucocytes et anti-plaquettes.
 - recherche d'anticorps anti-Gm.
 - dépistage et identification d'auto-anticorps anti-érythrocytes.

Nous avons pu automatiser une grande partie de ces examens, grâce à l'Auto Analyzer Technicon :

Qu'est-ce qu'un Auto Analyzer ?

L'Auto Analyzer est une chaîne d'éléments, reliés entre eux, réalisant automatiquement certaines manipulations normalement effectuées au cours d'une analyse manuelle. Le fonctionnement de l'appareil est fondé sur un principe dynamique : progression d'une veine liquide segmentée par des bulles d'air.

En bref, voici le déroulement des opérations ; les échantillons disposés dans les godets du distributeur, une pompe proportionnante multi-canaux, fonctionnant en continu, fait avancer les échantillons, l'un après l'autre ainsi qu'un certain nombre de flux de réactifs dans le circuit analytique. Le mélange des échantillons et réactifs, dans des conditions constantes, aboutit à une réaction chimique et au développement d'une coloration. On mesure l'intensité de cette coloration dans un colorimètre, les résultats s'inscrivant en une série de pics sur le papier d'un enregistreur.

Des bulles d'air segmentent continuellement les flux d'échantillons et de réactifs en mouvement assurant ainsi l'intégrité de l'échantillon et prévenant toute contamination.

Une chaîne Technicon se compose par exemple :

- d'un distributeur d'échantillons
- d'une pompe proportionnante
- d'un circuit où se fera la réaction souhaitée (agglutination), et le développement de la coloration (hémolyse)
- d'un colorimètre
- d'un enregistreur

Ceci représente un élément de base, permettant de réaliser à peu près toutes les réactions d'héماغglutination ou d'inhibition d'agglutination témoin d'une réaction spécifique antigène -anticorps (38)

...

Comment est obtenue et analysée cette agglutination ?

(Tableau 1)

Si l'agglutination résulte bien de la fixation de l'anticorps sur les globules rouges, certains paramètres peuvent intervenir dans cette réaction. Par exemple :

- L'utilisation de milieu macromoléculaire, d'enzymes, de solutions hypo ou hypertoniques, etc... (8 - 17 - 30 - 39).

Ces techniques visent à produire une agglutination artificielle en réduisant le potentiel "Zeta" que possède une hématie en suspension. Ce potentiel tend normalement à empêcher l'agglutination.

- Ces artifices sont utilisés dans l'Auto Analyzer où l'on emploiera par exemple :

- des hématies bromélinées,
- un agent macromoléculaire,
- des variations de pH ou de force ionique du milieu.

De ce fait, des anticorps normalement non agglutinants en solution saline, peuvent entraîner une agglutination. (39)

- Cette réaction, une fois effectuée, il existe deux moyens pour déceler la présence d'une agglutination spécifique :

. Soit recueillir directement sur papier les agglutinats, ce qui est le cas pour "l'Auto Analyzer de groupes sanguins".

. Soit se débarrasser de ces agglutinats par décantation.

On détermine alors la quantité de globules restant en les hémolysant. Si l'agglutination est complète, il n'y a plus de globules rouges libres ; l'hémolyse est alors nulle et donne une valeur "zéro" sur le colorimètre.

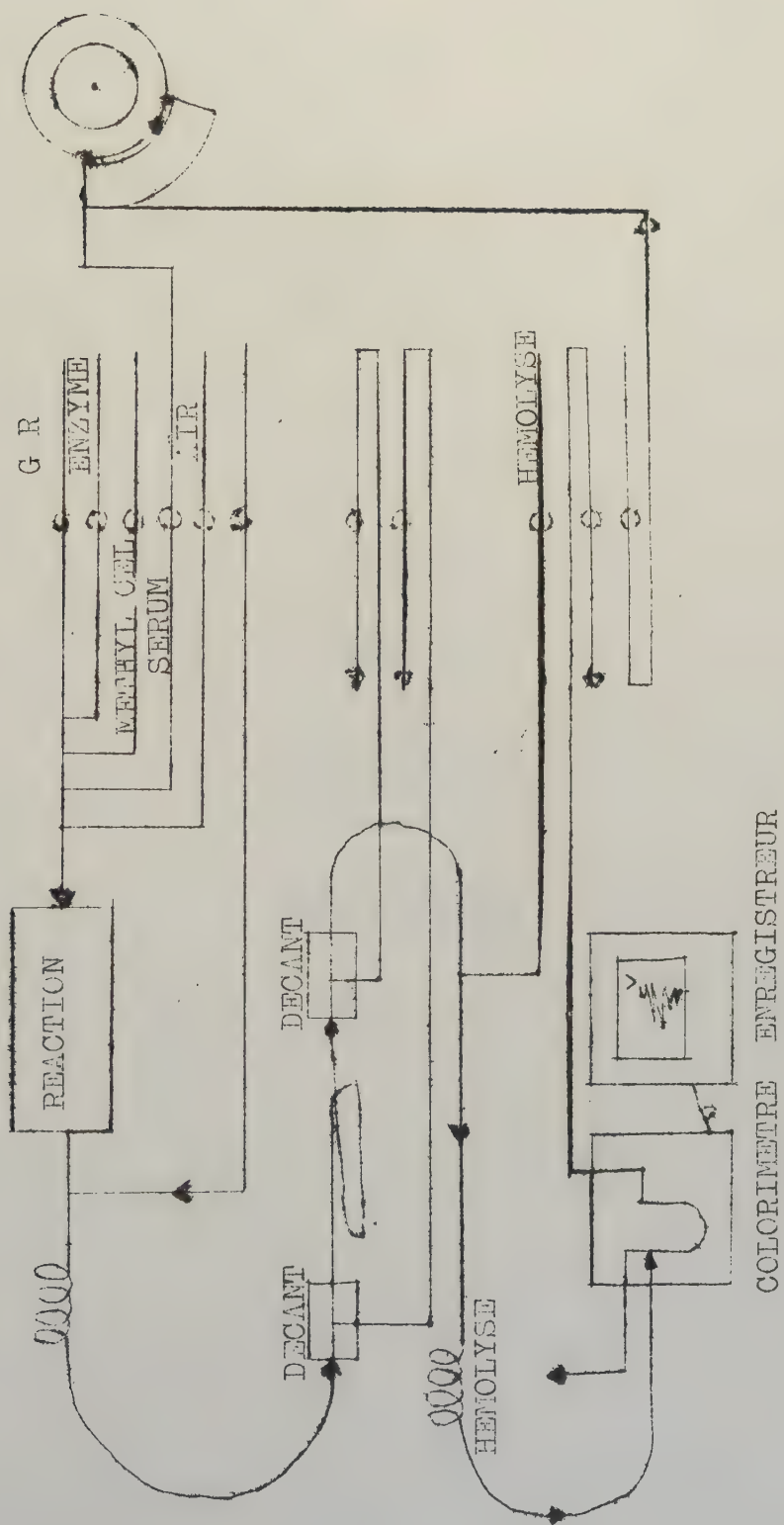
Par contre, en l'absence d'agglutination, très peu de globules rouges sont décantés et la plupart sont hémolysés. Ceci représente l'hémolyse maximum correspondant à une agglutination nulle.

On voit que tous les intermédiaires sont visibles entre ces deux types de réaction, et qu'il est possible d'obtenir une appréciation semi-quantitative de l'agglutination. Ceci peut par exemple permettre de différencier l'agglutination, par le même anticorps, d'un sujet hétérozygote ou homozygote pour un antigène donné, (M ou N, Fy^a, Jk^a) (1).

Les techniques d'inhibition d'agglutination font appel au même principe, et ont été utilisées pour l'étude des phénotypes Gm des immunoglobulines.

Si d'autres techniques immunologiques ont été appliquées à l'Auto Analyzer, comme la déviation du Complément (72), ou bien certains tests de floculation (35 - 37), nous n'en avons pas une expérience personnelle.

Nous avons surtout étudié les antigènes de groupes sanguins et les anticorps anti-érythrocytes, en faisant appel à des techniques d'agglutination directe, utilisant différents principes.





CHAPITRE II

APPLICATION A LA DETERMINATION QUALITATIVE DES ANTIGENES DE GROUPES SANGUINS

II° CHAPITRE

APPLICATION A LA DETERMINATION QUALITATIVE DES ANTIGENES DE GROUPES SANGUINS

Introduction

C'est dans ce domaine que les premières applications ont été effectuées en Immuno- Hématologie.

- D'une part, afin de déterminer les phénotypes ABO et Rh standard des donneurs ou des receveurs de sang.

- D' autre part afin d'étudier d'autres antigènes de groupes sanguins, soit dans un but transfusionnel, soit dans un but d'étude statistique ou immunogénétique.

- Si le principe de base est le même pour ces deux usages, c'est à dire créer une agglutination spécifique, témoin de la réaction spécifique antigène-anticorps, l'interprétation de cette agglutination fait appel à des techniques différentes :

- Dans le premier cas, lecture directe de l'agglutination.
(Auto Analyzer Groupes Sanguins)

- Dans le deuxième cas, hémolyse et dosage colorimétrique de l'hémoglobine libérée, provenant des hématies non agglutinées.

INTERET DANS LE CADRE DE LA TRANSFUSION SANGUINE. GROUPE
ABO et Rh STANDARD. (14 - 19 - 25 - 27 - 57 - 61)

Technique :

- l'Auto Analyzer utilisé se compose :
- d'un distributeur d'échantillons d'une contenance de deux cent échantillons, que l'on doit charger manuellement.

Le sang à examiner est recueilli sur anticoagulants (ACD), qui après sédimentation ou centrifugation se présente sous la forme d'une couche inférieure de globules rouges et d'une couche supérieure constituée de plasma.

Chaque échantillon est prélevé à l'aide d'une double pipette, l'une longue, servant au prélèvement des globules, l'autre courte servant à prélever le plasma.

Entre chaque prélèvement, cette double pipette est rincée par une solution de sérum physiologique, destinée à empêcher le transport d'un échantillon à l'autre.

Le temps de prélèvement est de 7 secondes, le temps de lavage de 23 secondes.

Comme dans tout Auto Analyzer, les fluides sont entraînés, par des pompes proportionnantes, et segmentés par des bulles d'air, afin de préserver l'individualité de chaque échantillon.

Le manifold se compose de dix circuits analytiques identiques.

- Sur sept canaux; est introduit le mélange globules rouges, sérums tests.
- Sur trois canaux, le plasma est testé vis à vis d'hématies

A₁¹ A₂ et B -

L'agglutination en cas de réaction positive se développe dans la première partie du circuit. Il existe une remise en suspension des agglutinats non spécifiques, à la fin de cette période.

Les agglutinats sont décantés, puis déposés directement sur une bande de papier filtre, qui se déroule de manière continue.

Une pompe à vide maintient une dépression sous le papier filtre, afin de coller les agglutinats à celui-ci.

Globules rouges et plasma sont traités différemment :

1°) Les globules rouges

On cherche à déterminer chez eux, la présence des antigènes A, B, D, (Rh^o) et H, afin d'aboutir à un groupage standard déterminant :

- le phénotype ABO
- le Rh standard (D)

La recherche de l'antigène H, est faite systématiquement afin de dépister d'exceptionnels sujets ne portant pas cet antigène (Bombay).

Ceci, est fait comparativement, à une méthode manuelle classique :
groupage ABO sur plaque d'opaline
groupage Rh en tube.

- Dans un premier temps, les globules rouges de chaque échantillon étudié, sont bromélinés.

Ceci se fait, par le mélange dans la proportion de un volume de globules rouges, pour deux volumes de broméline à 55%, en solution saline hypertonique à 13% .

Ce mélange est porté à 37°, dans une bobine thermostatée, pendant deux minutes.

Au bout de ce temps, le mélange globules rouges et broméline, est remis à la température du laboratoire, et une partie seulement, est utilisée pour être analysée dans chaque circuit.

Les globules rouges bromélinés sont alors mis en contact, avec le réactif ; celui-ci est constitué par le sérum test, dilué dans un milieu macromoléculaire, afin de favoriser la formation de "rouleaux" (PVP, Méthyl Cellulose ou Dextran).

L'agglutination se développe en huit minutes à la température du laboratoire. Au bout de cette période, on ajoute dans le circuit une certaine quantité de solution saline à 13 %, afin de disperser les agglutinats non spécifique.

Les agglutinats, lorsque la réaction est positive sont alors décantés et déposés sur le papier filtre, où l'interprétation est faite par une technicienne, comme pour un groupage sur plaque.

Réactifs employés :

- Sérums tests anti-A, anti-B, anti-AB, d'origine humaine. Ceux-ci sont dilués dans un milieu macromoléculaire, par exemple :
- Méthyl-cellulose 1%.
- Albumine 1%.
- Na Cl 9%.

Les taux de dilution sont variables selon les titres de l'anticorps. Ils doivent tenir compte des plus mauvaises conditions dans lesquelles on puisse se trouver, lors du groupage, (par exemple :

agglutination difficile de certains A²B). La dilution varie en général du 1/10 au 1/50e

- L'anti-D est un réactif d'origine humaine. Afin d'augmenter son affinité, il est dilué en Albumine et en Méthyl-Cellulose à des concentrations élevées

La dilution finale est en général de 1/40e. Utilisant des hématies bromélinées et un milieu très macromoléculaire, il est nécessaire de pratiquer un témoin de cette agglutination. Ce témoin doit rester négatif pour que l'agglutination ait une valeur spécifique. Il est l'équivalent du témoin albumine que l'on pratique lors de la détermination du groupage Rh standard. Pour cela, on utilise une chaîne témoin où les globules bromélinés sont mis en contact avec une solution d'Albumine, Méthyl-Cellulose et sérum AB, dans les mêmes concentrations que celles réalisées dans le réactif Anti D -

Le dernier antigène étudié est l'antigène H, afin de dépister les rarissimes sujets hh (Bombay) Le réactif employé est un réactif végétal (anti H Ulex Europaeus) à la dilution de 1/120e. Il permet d'ailleurs de différencier facilement les A₁ et les A₂.

2°) le plasma :

Les globules tests employés afin de tester le sérum (épreuve sérique), sont des globules A₁ A₂ et B

Ceux-ci sont utilisés à la concentration de 5% dans une solution légèrement hypertonique (13‰) contenant :

- Methyl-Cellulose 6g p. 1000
- Albumine 3%
- Broméline 3g p. 1000

Avant usage les hématies en solution sont portées à 37° pendant 5' dans un bain-marie constamment agité, puis mis immédiatement dans un bac contenant de la glace fondante, afin de stopper l'action de la broméline.

Ils sont gardés à cette température pendant toute la durée de l'emploi.

Pourquoi employer des hématies A_1 et A_2 ?

- afin d'être sûr de ne pas reconnaître un A faible qui posséderait un anti A_1 dans son sérum et dont l'image pourrait ressembler à celle d'un sujet de groupe 0 en l'absence de globules A_2 .

Interprétation des résultats :

- Sur l'Auto Analyzer est déterminé le phénotype ABO, à la fois par une épreuve globulaire (Beth Vincent) et sérique (Simonin)

En cas de discordance entre ces 2 épreuves le groupe est repris à la main et la cause de cette discordance notée. Il s'agit presque toujours d'un prélèvement de sang insuffisant qui n'a pas rendu possible l'épreuve sérique.

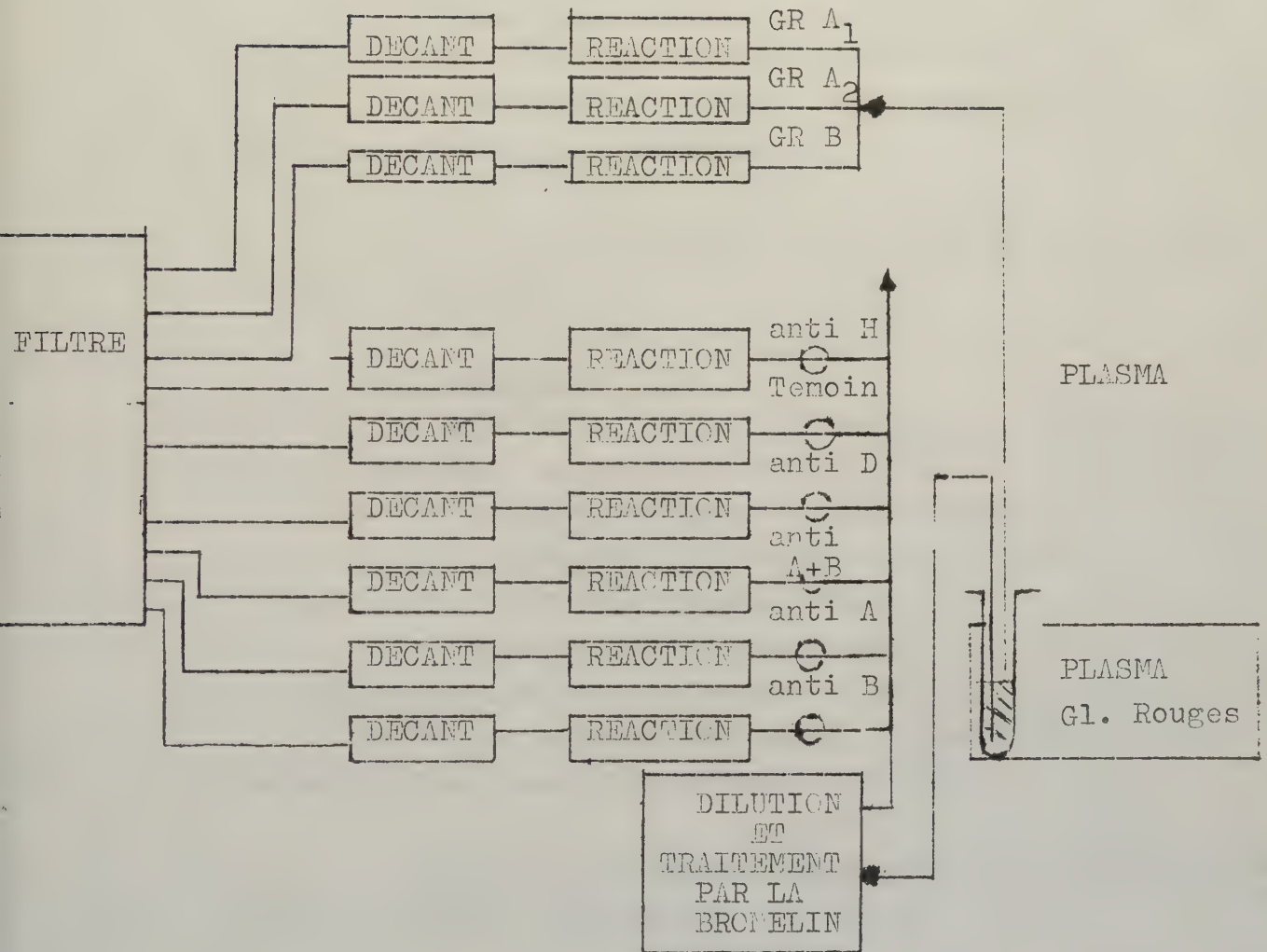
Le phénotype Rh est déterminé comme positif ou négatif par rapport au témoin qui doit rester parfaitement négatif.

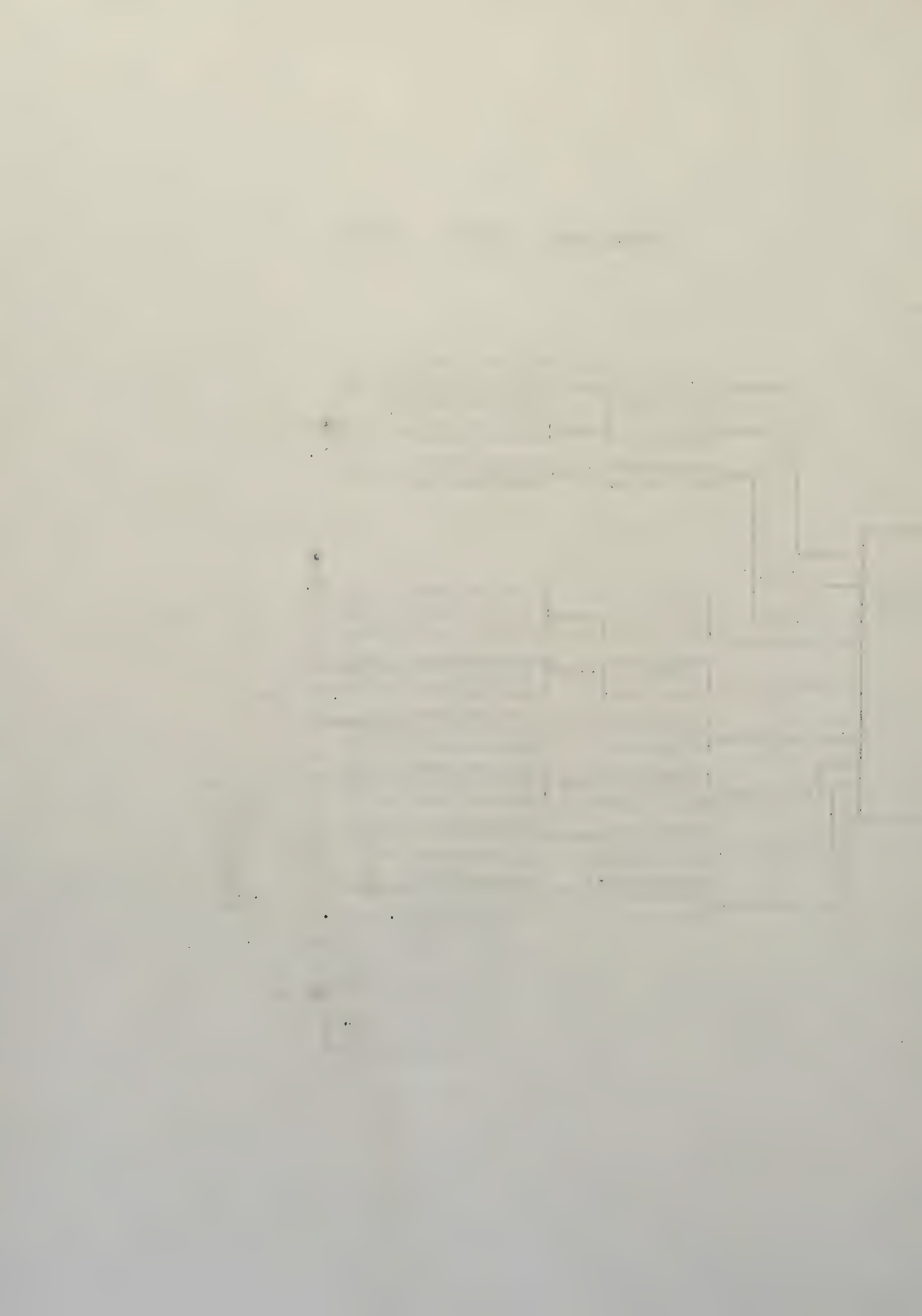
Ces résultats sont ensuite confrontés aux résultats obtenus manuellement :

1°) En cas de résultat concordant ;

- s'il s'agit d'un sujet Rh+ les résultats sont inscrits et le groupe du flacon ou du malade est considéré comme définitif.

AUTO-ANALYZER GROUPES SANGUINS





- s'il s'agit d'un sujet Rh- ou qui, dans l'une des techniques a donné une agglutination douteuse par l'anti D, on pratique une recherche automatique des antigènes D, C, E.

Ceci, afin de dépister les sujets D^u, rhⁱ ou rh^u qui ne doivent en aucun cas être transfusés à un receveur Rh négatif.

Nous verrons ce problème dans la deuxième partie de ce chapitre, puisque la méthodologie en est différente.

2°) En cas de discordance les groupes sont refaits directement à partir du tube prélevé.

Résultats :

Après une mise au point de six mois, la machine fut mise en service effectif. L'analyse des résultats porte sur une année de fonctionnement (6 décembre 1968 au 15 novembre 1969) et concerne ;

- 94.600 groupages effectués sur des donneurs de sang (Cf TABLEAU) et est comparable à l'expérimentation de Klinan à Boston (19)

Nous voyons d'emblée, que le nombre d'erreurs manuelles est beaucoup plus importante que celles dues au Technicon. D'autant, qu'au fur et à mesure du fonctionnement les techniques se sont améliorées et le nombre d'examen à reprendre est devenu plus faible.

Certaines erreurs notamment en ce qui concerne le Rh étaient dues, à de mauvaises dilutions des sérums tests.

Les seules véritables erreurs dues à l'appareillage lui même, sont dues au mode de prélèvement, de l'échantillon dans la roue du distributeur. De même, c'est à ce niveau que peuvent se produire les erreurs de mise en place de l'échantillon. Pour cette raison est pratiqué un contrôle de classement lors de la sortie des échantillons.

Tableau III

COMPARAISON DU GROUPAGE ABC ET Rh PAR L'AUTO ANALYZER
ET PAR LES METHODES MANUELLES

Nbre Examens	Discordances entre les 2 méthodes		Erreurs dûes à l'Auto Anal.		Erreurs Manuelles	
	A B O	Rh	A B O	Rh	A B O	Rh
74.127 du 6.VII.68 au 14.IX.69	3	153	1	(x) 23	2	(xx) 125
19.710 du 15.IX.69 au 14.XI.69	0	10	0	2	0	8
TOTAL : 94.837	3	163	1	30	2	133

(x) Dont 22 le même jour, par erreur de dilution de l'anti D

(xx) Dont 52 dûes à la présence de D^u, apparaissant d'emblée comme Rh positif sur l'Auto Analyzer.

Au total on peut retenir :

- sécurité supérieure aux technique manuelles
 - rapidité accrue des examens
 - sensibilité augmentée par rapport aux méthodes manuelles
- mais cependant assez faible, pour un appareillage automatique.
- reproductibilité appréciable
 - possibilité d'utiliser plusieurs techniques en même temps
- (Both Vincent, Simonin, détermination du Rh, recherche de Bombay etc...)

Par contre il faut noter :

- un appareillage de ce type ne réalise pas une économie de réactifs, particulièrement pour l'antiD, dont la consommation est supérieure à celle des techniques manuelles.

- L'automatisation n'est pas absolue : En effet, le chargement des échantillons dans le distributeur est manuel, et une erreur est toujours possible à ce niveau ; de même lors de la lecture car il n'est pas possible à l'heure actuelle, d'avoir une coïncidence formelle entre l'échantillon et le résultat déposé sous forme d'agglutinats sur le filtre continu.

- Cet appareillage est d'un maniment assez lourd, et nécessite un temps de mise en route de une heure minimum. Il est alors certain, qu'il ne devient rentable que pour un nombre d'examen dépassant plusieurs centaines.

- Enfin ses capacités de fonctionnement sont limitées et il est difficile de dépasser 600 à 700 échantillons examinés par jour.

B) APPLICATION EN DEHORS DES GROUPAGES STANDARDS ABO ET RH

Nous allons étudier dans cette partie la détermination qualitative des antigènes érythrocytaires autre que ABO et D, par l'Auto Analyzer.

Le principe repose là encore sur la création d'une agglutination favorisée par l'utilisation de globules bromélinés et de Methyl-Cellulose.

Ceci ne diffère guère de la méthode utilisée pour les groupages sanguins, mais la concentration en broméline est plus importante, ainsi que le temps de bromélinisation.

- La concentration en Methyl-Cellulose est aussi plus forte.

Enfin, les agglutinats, au lieu d'être déposés sur un papier filtre sont éliminés par décantation, et l'on dose colorimétriquement l'hémoglobine des hématies non agglutinées. Après hémolyse de celles-ci. (hémolyse mesurée par l'absorption de la lumière à 550 m μ)

Cette technique a l'avantage d'être beaucoup plus fine et sensible que la précédente.

C'est pour cela que,

- d'une part nous l'avons appliqué à la détermination des phénotypes Rh, des sujets D négatif,
- d'autre part, à la détermination d'autres antigènes, notamment d'antigènes rares, ou au contraire de très grande fréquence.

Phénotypes Rh

Chez tous les donneurs trouvés D négatif, lors du groupage Rh standard, nous pratiquons la recherche des antigènes C, E, et d'un éventuel antigène D faible (D^u), afin de savoir s'il ne s'agit pas en fait d'un donneur Rh', Rh'' ou D^u.

- Nous utilisons pour cela un Auto Analyzer 4 canaux dont l'un sert de témoin aux réactions.

L'Anti D est dilué au $1/300^e$

L'Anti C au $1/15^e$

L'Anti E au $1/30^e$

L'Anti D a été ajusté à cette dilution comme étant capable de reconnaître la plupart des sujets D^u ! (TABLEAU IV)

- D^u et Auto-Analyzer :

L'antigène D^u , est antigène soit faible, soit partiel. Parfois il est dû à un effet de position du gène D (exemple Cde / CDe) qui entraîne une diminution de son expression phénotypique.

Il n'y a pas de règles techniques précises définissant le D^u . Souvent, il apparaît comme un antigène D agglutiné par certains sérums et non par d'autres.

Dans l'ordre de la sensibilité, les techniques manuelles capables de mettre en évidence un antigène D^u , sont :

- l'utilisation du test de Coombs
- l'utilisation d'hématies bromélinées
- la fixation élution d'un anti D

Où se place la sensibilité de l'Auto-Analyzer dans cette échelle ?

La technique se révèle au moins aussi sensible que l'utilisation d'hématies bromélinées.

TABLEAU IV

PHENOTYPES Rh DES DONNEURS "D" NEGATIF

Groupes effectués.....	19 710
"D" négatif*.....	2 179
$\bar{C}\bar{c}ddee$	32
$\bar{c}\bar{c}ddeE$	27
$\bar{C}\bar{c}D^uee$	13
$\bar{c}\bar{c}D^ueE$	3
$\bar{c}\bar{c}D^uee$	11
$\bar{C}\bar{c}ddeE$	1

* Donneurs trouvés "D" négatif par "l'Auto-Analyzer de groupes sanguins".

Ceci correspond aux fréquences normalement attendues.

(Race and Sanger : Blood Groups in Man. Ve edition)

Nous pensons, qu'elle serait même l'équivalent de la fixation-élution, à la condition d'employer un sérum anti D très puissant et correctement dilué ; nous avons jusqu'ici, eu une bonne correspondance entre les épreuves de fixation-élution, et l'utilisation de cette technique automatique.

APPLICATION A D'AUTRES ANTIGENES DE GROUPE

C'est une technique identique qui a été appliquée à l'étude d'autres antigènes érythrocytaires : (TABLEAU V)

Nous avons pu rechercher la présence de l'antigène C^W , chez 1287 donneurs testés et mettre en évidence 33 C^W positifs, dépister à l'aide d'un anti $\bar{c}$ des sujets EE (R_2R^2), dont l'intérêt transfusionnel est de pouvoir être transfusé à des malades possédant un anti c sur 658 donneurs testés, nous avons trouvé 10EE

Il est possible dans les mêmes conditions de rechercher des donneurs Lo (a-b-) en utilisant un anti Lo^X , des sujets P_2 , Kell négatif etc...

Antigène Kp^h

Par ailleurs, nous avons ; testé 26.000 donneurs afin de rechercher un sujet négatif pour l'antigène Kp^b : Un seul sujet fut trouvé.

L'étude d'un aussi grand nombre fut rendu possible par l'utilisation du sérum dilué au 1/40e, alors qu'il aurait dû être employé pur, manuellement

La recherche de donneurs ne possédant pas un antigène de très grande fréquence ou un antigène public peut se faire de cette manière, par exemple afin de trouver des donneurs (2)

- LW négatif
- U négatif
- Cellano négatif
- I négatif
- Ko
- Lu (a-b-) etc...

A l'inverse, il est possible de rechercher dans une population donnée un "antigène privé".

Tableau V

ETUDE DE CERTAINS ANTIGENES DE GROUPES SANGUINS PAR
L'AUTO - ANALYZER

ANTIGENE	DILUTION DU SERUM	NOMBRE DE SUJETS TES- TES	RESULTATS
Kp ^b	1/40e	20.600	1 Kp(b-)
E	pur	658	10 EE
C ^w	1/100e	1.287	33 C ^w
I	1/300e	958	---
Radin (x)	1/4	3.338	2 Rd+

(x) Antigène privé

Nous avons aussi étudié 3.838 donneurs pour découvrir 3 sujets portant l'antigène Radin.

D'autres antigènes privés peuvent être étudiés de cette manière : Mg, Mi^a, M^t, Swann etc....

En conclusion, nous pouvons dire que grâce aux méthodes d'hémolyse, il est possible d'obtenir une technique sensible, économique, reproductible, et assez rapide, afin d'étudier qualitativement les antigènes de groupages sanguins, portés par le globule rouge.

C H A P I T R E I I I

DEPISTAGE ET IDENTIFICATION AUTOMATIQUE

D'ALLO-ANTICORPS ANTI-ERYTHROCYTAIRES EN

DEHORS DES IMMUNISATIONS FOETO-MATERNELLES

Depuis plusieurs années, des essais sont en cours afin d'automatiser le dépistage d'anticorps anti-érythrocytes, (21 - 23 - 24 - 27 - 28 - 31 - 32 - 46) :

1°) Dans le cadre des allo-immunisations foeto-maternelles.

Une technique utilisant l'Auto-Analyzer, est maintenant au point. Elle permet de plus, une appréciation quantitative de l'anti-D décelé chez la mère, en cas d'allo-immunisation due à une incompatibilité Rhésus.

2°) Dans le cadre de l'allo-immunisation transfusionnelle, auquel on doit ajouter le dépistage d'anticorps naturels avant toute transfusion (52 - 53).

La plupart des techniques automatiques décrites jusqu'ici employaient pour le dépistage de ces anticorps, la formation d'une agglutination artificielle par l'adjonction d'un agent macromoléculaire et l'usage d'hématies bromélinées (27 - 28 - 32 - 64).

Si, pour certains anticorps (anti-D), elles se sont révélées particulièrement sensibles, elles ne peuvent répondre au dépistage et à l'identification de tous les allo-anticorps.

Il existe, en effet, des différences de structure, d'affinité, et d'action selon le type d'anticorps et d'antigène envisagés, (anticorps agglutinants ou non agglutinants en saline, γG ou γM par exemple).

De plus, les enzymes détruisent certains antigènes de groupes sanguins (M, N, Fy^a).

Certains anticorps n'apparaissent agglutinants que par l'adjonction d'antiglobuline.

Nous décrirons ici une méthode qui, si elle n'est pas absolument polyvalente, semble avoir le plus large spectre possible. L'expérimentation en a été faite sur des malades destinés à être transfusés ou en cours de transfusion, comparativement aux méthodes nouvelles classiques.

Chez tout malade devant être transfusé, ou à fortiori déjà transfusé, il faut pratiquer un dépistage d'anticorps anti-érythrocytes qui pourraient être responsables d'un accident immunologique de transfusion.

1°) Pour tout malade dont on demande la détermination du groupe sanguin en vue de transfusion, on recherche la présence d'allo-anticorps, soit naturels, soit dus à une immunisation antérieure (grossesse par exemple) (3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 48 - 49 - 50 - 51)

Un tel dépistage met à l'abri des anticorps le plus fréquemment rencontrés :

- anti-D, C, E, $\bar{c}$, K
- anti-Le^a

D'autres anticorps comme l'anti-P₁, Le^b, Le^x, peuvent être décelés à cette occasion.

La technique de ce dépistage consiste à tester le sérum du malade vis-à-vis de globules rouges portant les antigènes correspondant aux anticorps énoncés ci-dessus, soit :

- une hématie CCDee
- une hématie $\bar{c}\bar{c}DEE$
- une hématie $\bar{c}\bar{c}ddee$

pour les antigènes du système Rhésus.

Ces globules rouges sont bromélinés, afin de sensibiliser la réaction, et mis en suspension saline à 5 %. C'est par eux que seront décelés les anticorps correspondant aux antigènes du système Rhésus.

- Un échantillon K+, $\bar{c}\bar{c}ddee$, sera utilisé en sérum AB, ou après action de la trypsine, afin de déceler la présence d'un anti-Kell.

- Pour dépister les anti-Lewis on utilisera
- une hématie Le(a+b-)
- une hématie Le(a-b+)
- une hématie Le(a-b-)

Le sérum du malade sera testé vis-à-vis de ces trois globules par le test de Coombs indirect en utilisant une anti-globuline à prédominance anti-Complément (C').

En cas de dépistage positif sur ce sérum on pratiquera une recherche d'agglutinines irrégulières complète. (48 - 51 - 53)

2°) C'est cette recherche que l'on doit pratiquer chez tout malade transfusé. Il faut à intervalle régulier chercher à déceler l'apparition d'allo-anticorps secondaires aux transfusions reçues. Ceci est d'autant plus impératif s'il existe des réactions transfusionnelles (frissons, hyperthermie, accident hémolytique).

Le sérum du malade est testé vis-à-vis d'une gamme d'hématies de groupe 0.

Par exemple, on utilisera dix hématies différentes rassemblant entre elles plusieurs combinaisons antigéniques, permettant d'identifier un et parfois plusieurs anticorps. Dans ce dernier cas, il faudra parfois étudier le sérum vis-à-vis d'un nombre plus important de globules rouges afin de discriminer les différents anticorps.

Cet examen associe des techniques différentes afin de mettre en évidence des anticorps de types différents γM , γG , agglutinants ou non agglutinants, actifs à différentes températures.

Le sérum sera testé vis-à-vis :

- D'hématies en solution saline,

- D'hématies traitées par enzymes :

- . Broméline
- . Trypsine

- Par le test de Coombs indirect :

- . Soit sur hématies normales
- . Soit sur hématies traitées par enzymes.

Lors de ce test de Coombs indirect, la fixation de l'anti-corps est mise en évidence par deux types d'anti-globulines.

- L'une à prédominance anti- γ G
- L'autre à prédominance anti-C'

Ces techniques associées permettent dans la majorité des cas, l'identification des anticorps suivants :

- Soit les allo-anticorps naturels

- . anti-Le^a, Le^b, Le^x
- . anti-P₁
- . anti-M, N
- . anti-S parfois
- . anti-Lu^a

- Soit les allo-anticorps d'immunisation

- . anti-D, D+C, D+C+E
- . anti-E
- . anti-C
- . anti-c
- . anti-K, anti-Cellano
- . anti-Fy^a
- . anti-Jk^a, Jk^b
- . anti-S parfois
- . anti-s

L'identification de ces anticorps doit amener à faire transfuser ces malades par du sang sélectionné ne portant pas les antigènes correspondants.

Nous étudierons ici l'expérimentation qui a été faite, afin de remplacer ces techniques manuelles par des techniques automatiques utilisant l'Auto-Analyzer Technicon.

Principe des Méthodes Automatiques

Il vise à obtenir une agglutination artificielle.

Plusieurs possibilités peuvent entraîner un tel phénomène en agissant sur le potentiel Zeta que possède toute hématie en solution dans un milieu quelconque,

- Soit par action directe sur la membrane érythrocytaire. C'est dans ce sens qu'agissent les enzymes protéolytiques (Broméline, Ficine, Trypsine, Papaine, Pronase). (30)

- Soit en jouant sur les constantes di-électriques du milieu de suspension des hématies.

C'est de cette manière qu'agissent :

- 1) Les agents macromoléculaires (Albumine, P V P, Dextran, Méthyl-cellulose, etc...)
- 2) Les variations de pH du milieu. (39 - 40 - 46)
- 3) Les variations de concentration ionique du milieu de suspension des hématies. (46)
- 4) Enfin des macromolécules possédant une ou plusieurs charges électropositives

macromolécules bi-cationiques, tel le Polybrène ou le Sulfate de Protamine,

C'est à ces derniers principes que font appel les Techniques Automatiques que nous allons décrire, dérivées de celles décrites par P. Lalezari en 1968, utilisant l'Auto-Analyzer. Cette technique repose sur l'obtention d'une agglutination non spécifique, due à :

1) L'abaissement du pH et de la concentration ionique, qui de plus favorise la fixation rapide de l'anticorps sur l'antigène. (38)

2) L'adjonction d'une macromolécule bicationique (Polybrène*) qui entraîne au bout de quelques minutes une agglutination complète des hématies.

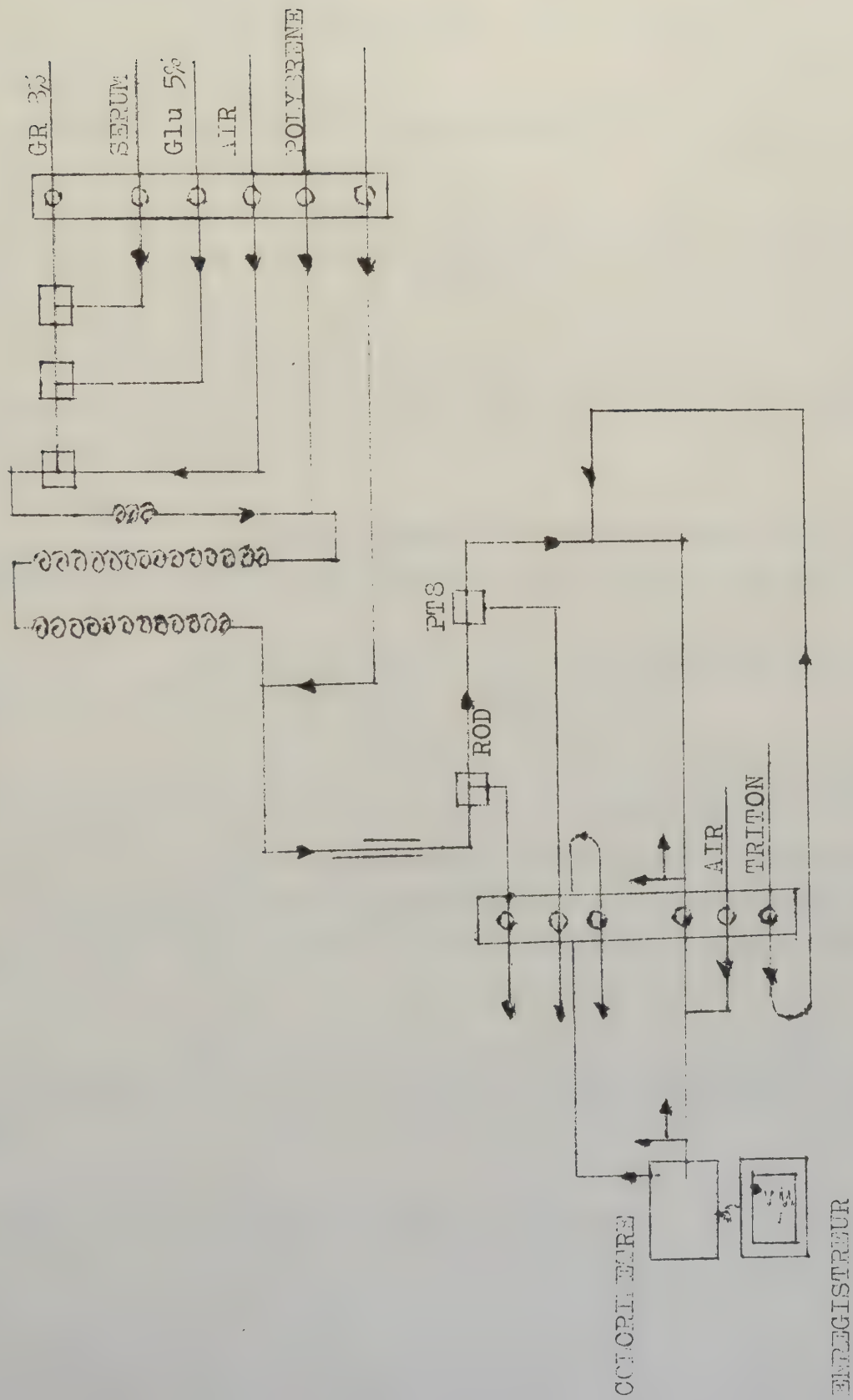
3) Cette agglutination est réversible, car si on ajoute, au bout d'un temps ne dépassant pas 15 minutes, une solution hypertonique et tamponnée, qui rétablit le pH et la concentration ionique, on obtient une désagglutination et une remise en suspension des hématies antérieurement agglutinées.

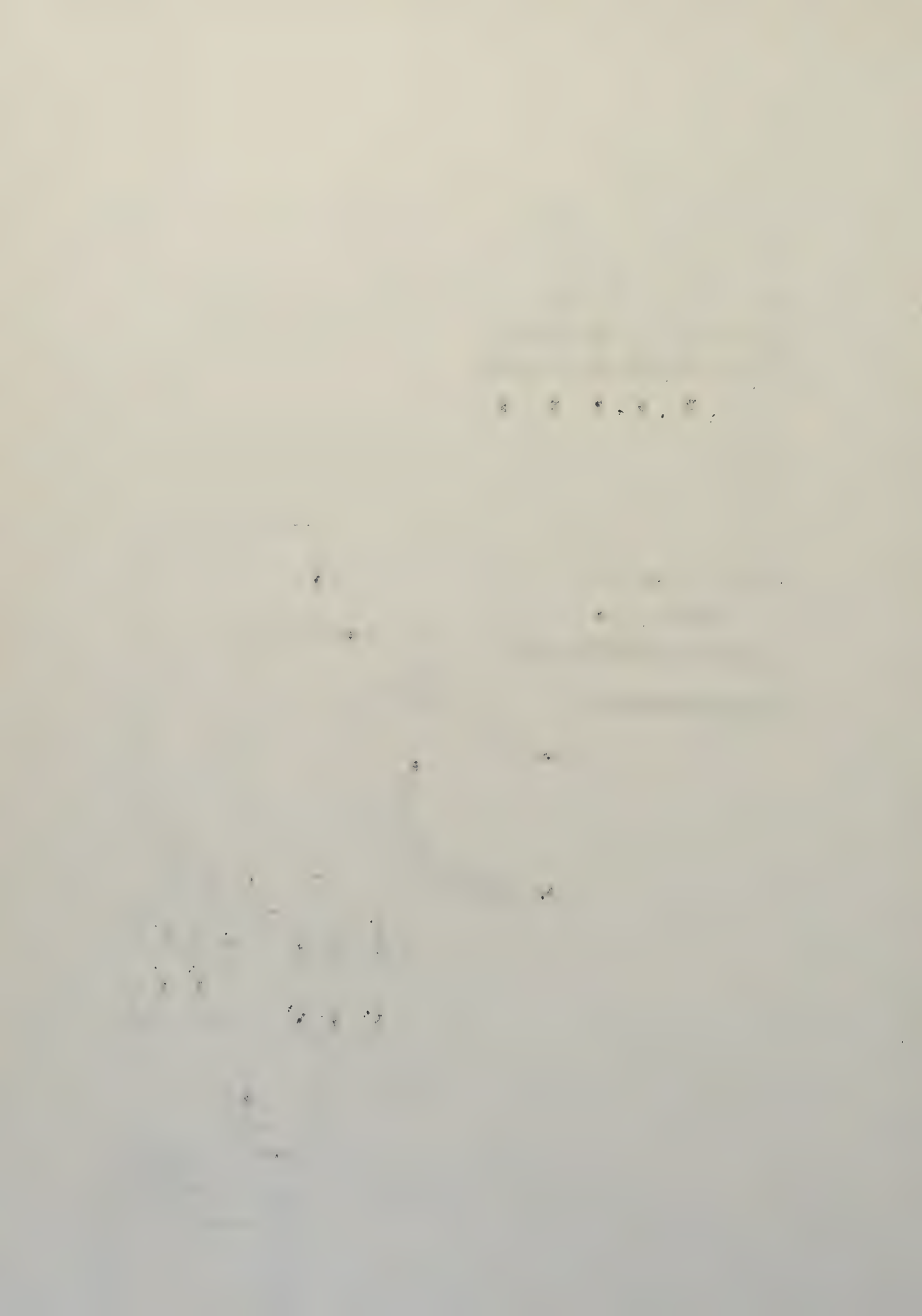
- Cette remise en suspension, cependant, ne se fait qu'en cas d'absence d'anticorps. En effet, c'est dans ce cas que la réaction d'agglutination devient spécifique : la présence d'anticorps fixé à la surface du globe rouge empêche dans la majorité des cas la remise en suspension et les hématies restent fortement agglutinées malgré l'adjonction du tampon hypertonique.

- Si une telle agglutination persiste, il est alors facile d'éliminer par décantation les agglutinats et d'hémolyser les globules rouges non agglutinés. L'importance de l'hémolyse est donc inversement proportionnelle à l'agglutination, et une hémolyse nulle est le témoin d'une agglutination complète.

- Cette hémolyse est appréciée colorimétriquement par la recherche de l'absorption à $440 \text{ m}\mu$, d'un faisceau lumineux traversant la solution hémolysée. (p Tableau VI)

pH : 3





Les réactifs employés :

- Sérum de chaque malade ;
- Globules rouges testés à la concentration de 8 % en solution saline isotonique comprenant 0,25g^o/oo de Ficoll ;
- Glucose 5 % acidifié par acide citrique à raison de 1 ml d'acide citrique molaire pour 500 ml de glucose à 5 %. Le pH doit être compris entre 2,9 et 3,1. Cette solution, lors du mélange des globules rouges et du sérum à tester abaisse la force ionique et le pH du milieu.
- Le Polybrène* utilisé à la dilution finale de 1/5000e. Cette macromolécule bi-cationique entraîne une agglutination réversible de tous les globules rouges quel que soit leur groupe.

La remise en suspension des globules agglutinés de manière non spécifique, se fait par une solution de Citrate de Sodium trisodique 0,2 M - pH 7,4.

Les globules rouges lavés 3 fois, sont dilués à 8 % en eau physiologique à 9^o/oo contenant 0,25g de Ficoll par litre.

La solution d'hémolyse est constituée d'eau distillée dans laquelle on ajoute du Triton x 100 à raison de 2,5 ml pour 1000 ml.

La solution de lavage du circuit destinée notamment à empêcher ou diminuer la contamination entre les échantillons est constituée d'un mélange :

- d'Albumine Bovine à 4 % et de sérum AB humain à 3 %, en sérum physiologique à 9^o/oo.

Nous verrons plus loin pourquoi on ne peut employer une solution saline simple comme solution de lavage entre le prélèvement de chaque échantillon.

* Polybrène, Abbott Laboratories - Chemical Co Inc.

Nous avons, dans les conditions décrites ci-dessus, utilisé une double chaîne Auto Analyzer comprenant :

- Un Sampler type II distributeur d'échantillons à raison de 30 par heure ;
- Une pompe type II ;
- Un manifold composé de : (voir schéma)

1) une première bobine où se produit la fixation de l'anticorps en milieu acide et hypotonique.

2) Une succession de bobines où, après adjonction de Polybrène, se produit l'agglutination.

3) Une bobine permettant la remise en suspension des agglutinats non spécifiques.

4) Un système de sédimentation et de décantation des agglutinats restants.

5) Une bobine où se fait l'hémolyse des globules rouges non agglutinés, par adjonction d'eau distillée + Triton x 100.

6) Cette hémolyse passe ensuite à travers la cuve d'un colorimètre où est mesurée l'absorption par rapport à une cellule de référence d'un faisceau lumineux à travers un filtre de 440 m μ .

7) Cette absorption est amplifiée et inscrite sous forme de courbe sur un enregistreur. La concentration en hémoglobine est proportionnelle au logarithme de la densité optique enregistrée.

8) Le réglage de l'appareil se fait :

- d'une part en constituant une hémolyse complète, c'est-à-dire en faisant passer à la place des sérums testés un sérum humain ne contenant aucun anticorps.

Ceci correspond à l'absence complète d'agglutination et constitue l'hémolyse maximum.

- d'autre part, en créant une agglutination maximum : il suffit pour cela de remplacer la solution de resuspension par une solution saline à 9⁰/100. La désagglutination ne se fait pas et l'on obtient ainsi l'image d'une agglutination maximum par cette méthode.

9) Les globules rouges testés passent en continu dans le

circuit. Les sérums à étudier sont pompés pendant 1 minute. Ce prélèvement est suivi d'un lavage d'une durée égale.

Résultats :

Cette technique a été essayée comparativement aux techniques manuelles classiques dans les deux conditions suivantes :

1) Le dépistage d'anticorps pratiqué lors de toute détermination de groupe sanguin en vue de transfusion (de 60 à 110 par jour).

2) L'identification des anticorps après dépistage positif, correspondant à une recherche d'agglutinines irrégulières.

A) DEPISTAGE D'ANTICORPS

On utilise une double chaîne afin de pouvoir disposer de deux types d'hématies testées rassemblant entre elles le maximum d'antigènes. En effet, l'expérimentation a montré que de travailler sur des mélanges de globules rouges diminuait considérablement la sensibilité de la méthode.

Les globules rouges employés sont par exemple :

L'un :

- P₁, MN $\overline{s}$ s, C $\overline{c}$ DEe, K+, Le(a-b+), Fy(a+), Jk(a+b-)

L'autre :

- P₁, MNSS, C $\overline{c}$ DEe, K-, Le(a+b-), Fy(a+), Jk(a+b+)

Il est impératif de réunir sur les deux types d'hématies les antigènes suivants :

- D, C, E, $\overline{c}$, e

- Kell

- P₁_a

- Le^a

- Le^b

et plus accessoirement :

- M, N, S, $\overline{s}$

- Fy^a, Jk^a etc...

Les sérums de chaque malade sont décantés et rangés par dizaines. Entre chaque dizaine est disposé, dans le sampler, un godet rempli de solution saline isotonique. En effet, il est apparu que dans les conditions de la méthode, l'adjonction d'eau physiologique à la place du sérum humain ou de la solution de rinçage (albumine + sérum AB) rendait l'agglutination non spécifique irréversible. Ceci est d'ailleurs utilisé afin de régler sur l'appareil le zéro de la méthode (voir ci-dessus).

De ce fait, un marqueur apparaît tous les 10 échantillons, et rend le repérage des sérums plus aisé.

La température de la réaction est celle du laboratoire, comprise entre 18 et 22°C, zone où apparaissent aussi bien les anticorps "froids" que les anticorps "chauds".

Les résultats négatifs s'inscrivent sous forme d'une hémolyse complète 100 % (cf Tableau VI). Seuls apparaissent en positif les marqueurs constitués par la solution saline (tous les 10 échantillons).

Un dépistage positif témoin de la présence d'un anticorps s'inscrit sous forme d'un pic, constitué par la diminution de la densité optique puisqu'il y a une diminution de la teneur en hémoglobine passant devant le colorimètre.

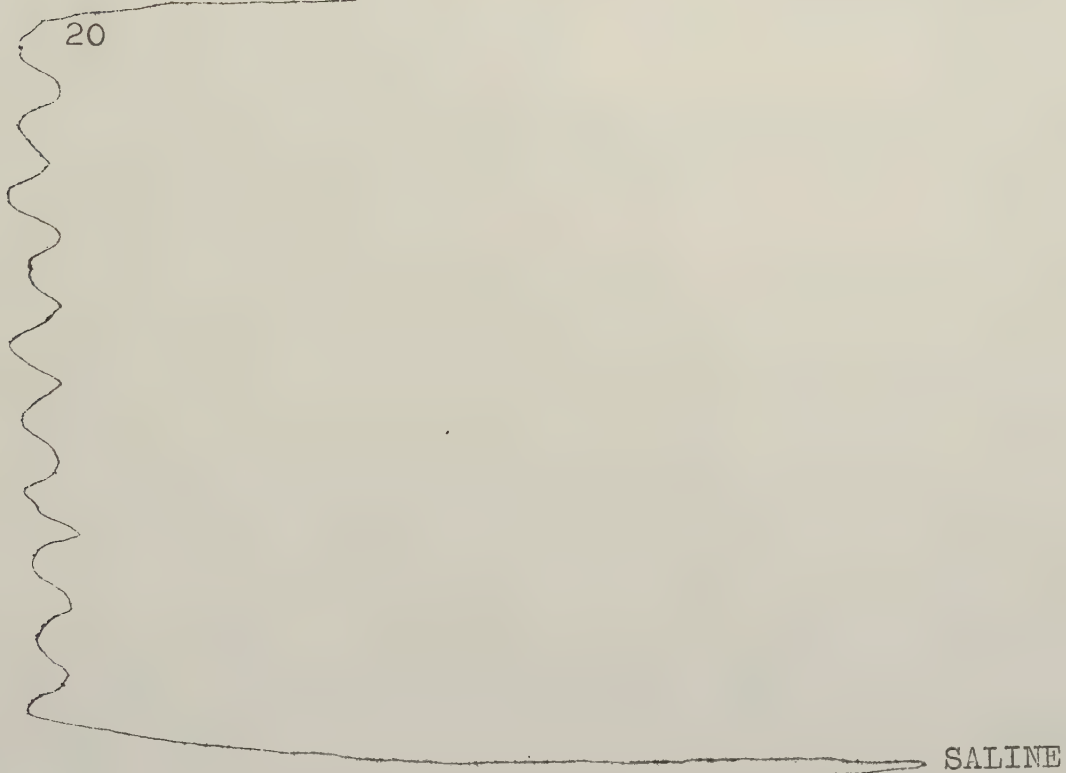
La hauteur du pic est proportionnelle à l'augmentation de la densité optique et donc de l'importance de l'agglutination.

Rythme du dépistage : 30 échantillons à l'heure.

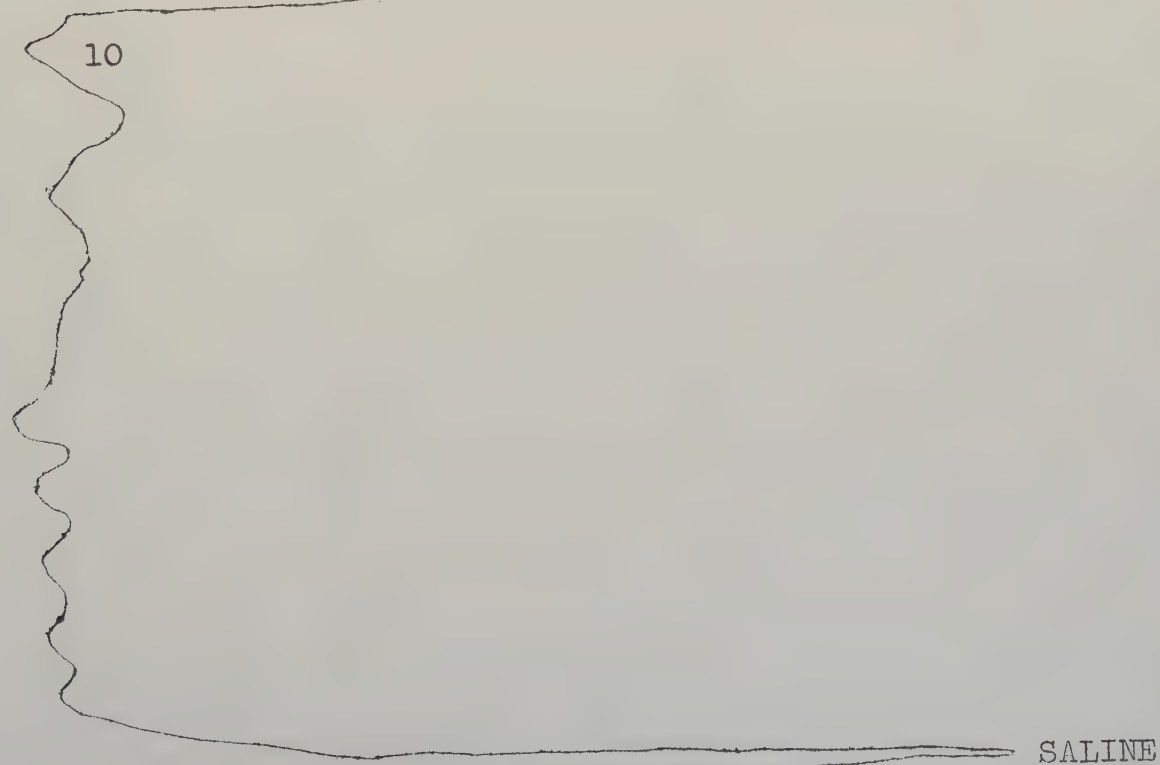
Quantité de sérum utilisé : 1 ml.



20

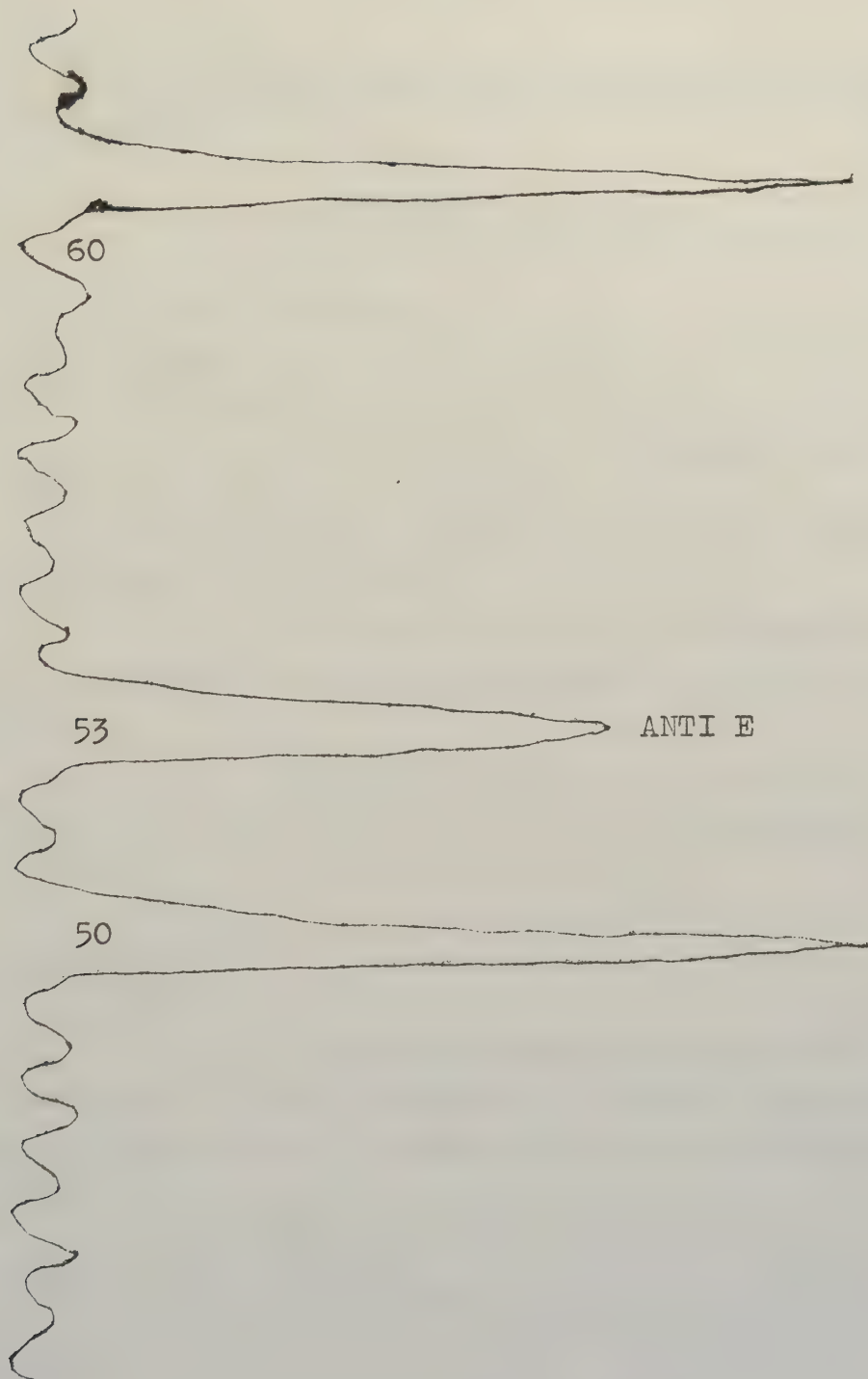


10



1

DEPISTAGE D'ANTICORPS



Quels sont les allo-anticorps anti-érythrocytes capables d'être détectés par cette méthode ?

Les allo-anticorps naturels :

- La plupart des anti-P₁ ;
- Les anti-M, N ;
- L'anti-S parfois.

Et ceci en général de manière plus sensible que par les techniques les révélant habituellement,

- telle l'utilisation d'hématies en saline 22°C ou d'hématies trypsinées en solution saline pour les anti-P₁.

La température joue ici un rôle important pour la détection de ces anticorps et ils sont d'autant mieux détectés que la température est plus basse.

Mais, dans ces conditions, on est gêné par la détection de très nombreuses agglutinines froides (anti-I) qui apparaissent sans signification pathologique chez 10 à 20 % des sujets testés.

Les Anti-Lewis

- Anti-Le^a

Certains sont détectés par cette méthode. Ils correspondent généralement à ceux qui apparaissent comme agglutinants par d'autres techniques que le test de Coombs, par exemple agglutinant les hématies trypsinées ou bromélinées.

Les anti-Le^a qui ne sont détectés que par le test de Coombs indirect, ne sont généralement pas décelés par cette méthode automatique.

Nous avons remarqué le même phénomène pour les anti-Le^x et anti-Le^b.

Parfois, pour certains anti-Le^x, on ne décèle que l'agglutination due à la fraction anti-Le^a. La dilution du sérum dans le circuit fait que les anti-Le^a hémolysants sont bien détectés car ils n'entraînent pas d'hémolyse des globules tests.

Deux anti-Lu^a n'ont pas été décelés par l'Auto Analyzer alors qu'ils étaient actifs en saline.

Les allo-anticorps immuns anti-érythrocytes :

Les anti-D, D+C, C, $\bar{c}$, E, C^W, $\bar{e}$ (pour ce dernier, auto- ou allo-anticorps), ont été parfaitement décelés et de manière beaucoup plus sensible que manuellement. Ils posent même souvent des problèmes de contamination, obligeant parfois à reprendre l'examen des 2 ou 3 sérums suivant un échantillon contenant cet anticorps. Certains, particulièrement actifs, se sont révélés capables de souiller l'ensemble du circuit et jusqu'à 20 sérums suivant l'échantillon contaminant.

Les anti-Kell sont généralement bien dépistés.

Pour les autres systèmes, il a été possible de détecter :

- 3 anti-Fy^a
- 2 anti-Jk^a
- 3 anti-Jk^b
- 1 anti- $\bar{s}$
- 1 anti-Kp^b

Les anti-Fy^b, Lu^b, Cellano, Kp^a n'ont pas été testés.

Nous verrons le problème d'un mélange d'anticorps au chapitre de l'identification.

Au total, en ce qui concerne le dépistage d'anticorps, se pose surtout le problème pour certains anticorps naturels de type γ^M : anti-Lewis, anti-Lu^a.

Ceci nous a amené à envisager un autre type de système automatique qui serait constitué par une technique dérivée du test de Coombs manuel, afin d'être certain de ne pas méconnaître la présence d'un anticorps, ceci étant surtout important pour les anti-Le^a.

B) L'IDENTIFICATION DE LA SPECIFICITE D'ALLO-ANTICORPS ANTI-ERYTHROCYTES

Elle repose sur les mêmes principes, seulement il faut disposer d'une gamme d'hématies testées beaucoup plus importante (10 échantillons ou plus).

La disposition du circuit est inversée de celle du dépistage, c'est-à-dire que le sérum contenant un anticorps à identifier est pompé en continu dans le circuit et mis en présence des globules rouges du Panel injectés dans le circuit de manière séquentielle.

Le sérum est, comme dans les techniques manuelles, mis en présence d'une liste de globules rouges telle :

1	MNS $\bar{s}$	P ₁	C $\bar{c}$ dd $\bar{e}$ e	K- k+	Kp(a-b+)	Le(a-b+)	Fy(a-b+)	Jk(a+b-)	Lu(a-)
2	M S $\bar{s}$	P ₂	ccddE $\bar{e}$	K- k+	Kp(a-b+)	Le(a-b+)	Fy(a+)	Jk(a+b+)	Lu(a-)
3	M SS	P ₁	CCD $\bar{e}$ e	K- k+	Kp(a-b+)	Le(a-b+)	Fy(a+)	Jk(a-b+)	Lu(a-)
4	N $\bar{s}$ $\bar{s}$	P ₁	$\bar{c}$ cdd $\bar{e}$ e	K+ k+	Kp(a-b+)	Le(a+b-)	Fy(a+)	Jk(a-b+)	Lu(a-)

Etc...

et l'on recherche avec quels échantillons persiste une agglutination spécifique.

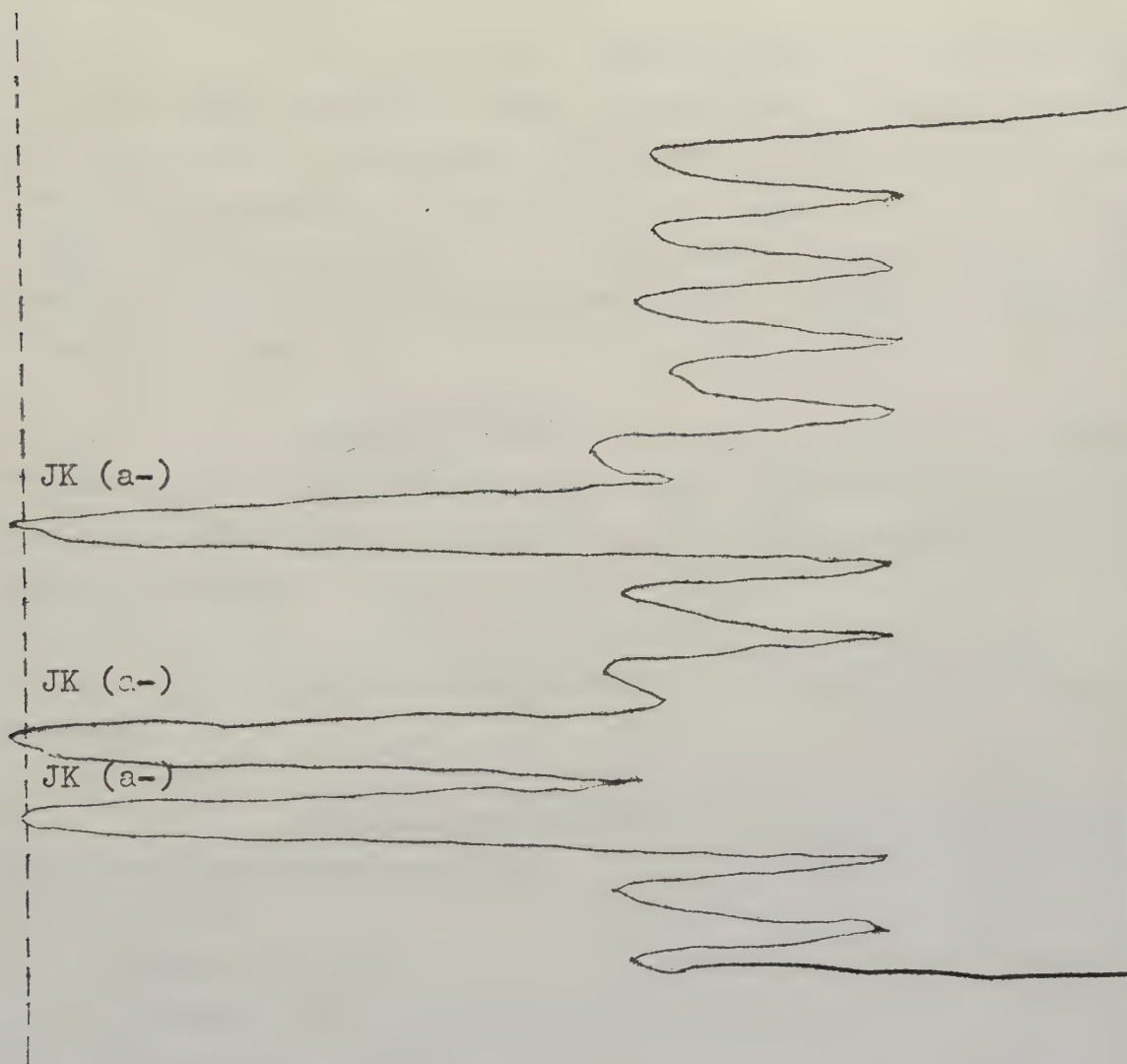
L'inscription graphique des résultats est inverse de celle du dépistage (cf Tableau VII).

Dans un premier temps, afin de servir de témoin d'hémolyse, tous les globules passent dans le circuit, en présence d'un sérum dépourvu d'anticorps. L'hémolyse de chaque échantillon est enregistrée sous forme d'un pic correspondant à l'hémolyse totale en l'absence d'agglutination : hémolyse 100 % de la méthode.

Ceci sert de témoin, et toute diminution, pour chaque échantillon, de la hauteur du pic d'hémolyse par rapport au témoin signifie qu'il s'est produit une agglutination.

Il est ainsi possible d'identifier, soit un anticorps, soit un mélange d'anticorps, en employant au besoin une liste plus importante d'échantillons, à la seule condition que cet (ou ces) anticorps soient agglutinants dans cette technique.

IDENTIFICATION D'UN ANTI JK^a



Les spécificités dépistées indiquées ci-dessus ont pu être identifiées de cette manière.

Il faut souligner que pour certains allo-anticorps naturels cette technique a permis de mettre en évidence :

Dans le système P, l'hétérogénéité de la force de l'antigène P. Un anti-P₁ donné, agglutine de manière très différente des échantillons P₁. Certains apparaissent agglutinés à 100 %, d'autres environ à 50 %, et d'autres enfin, très peu agglutinés (P weak). Ceci est d'autant plus vrai que l'anticorps auquel on a à faire est faible et peu avide. Nous avons donc retrouvé par cette technique la même image que l'on obtient d'habitude lorsqu'on a à identifier ou à tester un anti-P₁.

Pour les anti-M et les anti-N, il a été facile de vérifier l'importance de l'effet de dose pour un anticorps spécifique de ces antigènes. Les sujets hétérozygotes apparaissent beaucoup moins bien agglutinés que les sujets homozygotes.

De tels phénomènes sont surtout observés pour les anticorps naturels.

Cependant, en diluant certains sérums, nous avons pu mettre en évidence cet effet de dose pour :

- l'anti- $\bar{c}$
- l'anti-e
- l'anti-Jk^a
- l'anti-Fy^a

Une telle observation avait d'ailleurs été faite par Allen et Rosenfield, mais en employant une technique d'agglutination directe (1).

Lors des essais d'identification de tels anticorps, est apparu un phénomène encore inexpliqué : certains sérums sont capables d'inhiber l'agglutination non spécifique et donc d'entraîner une réaction négative. Ce fait avait déjà été noté par P. Lalezari pour des sérums anciens ou contaminés (24). Il nous a semblé dans ces cas qu'il ne s'agissait pas de tels sérums, mais de sérums contenant une concentration élevée en protéines, provenant de malades porteurs de myélome, Waldenström, cirrhose, etc...

La dilution de ces sérums par de l'eau physiologique afin de ramener une concentration en protéines normale a permis de retrouver une agglutination non spécifique, mais le plus souvent une telle dilution a fait disparaître l'activité de l'anticorps.

Les auto-anticorps :

Lors du dépistage, la présence d'un auto-anticorps dans le sérum du malade ne se distingue pas d'un allo-anticorps, mais lorsque le sérum est repris vis-à-vis d'un Panel d'hématies, il donne une agglutination avec tous les échantillons de globules rouges et avec ses propres globules rouges.

Ceci peut être le fait :

- Soit d'une anémie hémolytique à auto-anticorps de type γ^M ou γG .

C'est dans ce dernier cas qu'il est parfois possible de déceler une spécificité anti-e à cet auto-anticorps, associée ou non à une spécificité anti-hr.

- Soit de la présence :

- . d'un anti-H chez un sujet A_1 ou A_1B ;
- . plus fréquemment d'un anti-I.

De même, certaines hématies en l'absence de tout anticorps ont la faculté de s'agglutiner et de ne pas être remises en suspension. Ce fait est peut-être à rapprocher des agglutinations spontanées de globules rouges mis en milieu albumineux ou traités par la broméline.

Intérêt de la méthode

Bien qu'elle apparaisse comme méthode polyvalente à large spectre, il ne faut pas croire qu'elle puisse déceler tous les types d'anticorps. Ce qui nous est apparu particulièrement intéressant est la possibilité de pouvoir travailler :

- plus rapidement ;
- de manière plus sensible et plus reproductible ;
- en outre, elle n'utilise pas d'enzymes, ce qui permet de conserver des antigènes détruits en partie par les enzymes (M, N, Fy^a).

Rapidité :

- Trente sérums peuvent être testés par heure pour le dépistage.
- Trois sérums par heure en identification. Ce rythme pourrait, peut-être être porté à 5 par heure.

Malheureusement, pour le moment la quantité de sérum nécessaire est la même que manuellement, voire supérieure. Une micro-méthode permettant de réduire cette quantité est actuellement à l'étude.

La reproductibilité des résultats est certainement meilleure, l'importance de l'agglutination est mesurée par l'hémolyse des globules restants. Elle est sujette à moins de variations subjectives, que lors d'une lecture microscopique ou macroscopique.

Elle nécessite cependant, pour être valable, un étalonnage correct et précis de l'appareil et l'interprétation doit toujours être faite vis-à-vis de la courbe témoin.

La sensibilité est très certainement supérieure à la moyenne des réactions manuelles (même les plus précises, Enzymes, Coombs), à tel point que ceci peut devenir gênant pour certains anticorps contaminants (anti-D par ex.).

Quelques exemples permettent d'en juger :

- Un anti-D non trouvé par des méthodes manuelles sensibles telle que l'utilisation d'hématies bromélinées a été détecté et identifié par cette technique.

- Les titrages d'anticorps effectués montrent des différences importantes : par exemple, pour de nombreux anti- $\bar{c}$, des titres de l'ordre du 1/10 000 à 1/15 000 sont atteints, alors que manuellement le titrage ne dépasse pas 1/64e ou 1/128e.

Des dilutions identiques sont possibles avec des anti-D, anti-E, etc...)

- Un allo-anticorps d'immunisation anti-Jk^b a pu être utilisé dilué au 1/4 alors que manuellement il n'agglutinait que les sujets homozygotes pour cet antigène.

Ceci a permis notamment de déterminer les phénotypes Jk^b de certains donneurs.

Deux anti-Fy^a, non détectables manuellement ont pu être identifiés par cette technique.

A l'inverse, les anti-Lu^a, de nombreux anti-Lewis, certains anti-P₁ sont inactifs.

L'anti-Kell montre la même sensibilité que manuellement lorsqu'il est dépisté par des hématies en sérum AB.

Les raisons de ces différences de sensibilité ne sont pas claires.

La méthode se déroule en trois phases :

1) Dans la première phase, les globules rouges sont rapidement sensibilisés par les anticorps, grâce à l'abaissement du pH et de la force ionique, ceci ayant été bien démontré pour les anticorps du système Rh (8 - 15).

2) La seconde phase est l'agglutination par le Polybrène. Cette phase permet à des anticorps non agglutinants de le devenir.

3) La troisième phase, sur laquelle repose toute la sensibilité de la méthode, entraîne une réversibilité de l'action du Polybrène.

La résistance à la resuspension lorsqu'un anticorps est fixé dépend de l'importance de la force de liaison de l'anticorps à l'antigène.

Elle dépend aussi de la température de la réaction. Aussi, si on abaisse la température, on augmente la fréquence des anticorps "froids" dépistés (M, N, P₁, Le^a). Mais la réduction de la température augmente considérablement le nombre des agglutinations dues à l'anti-I.

Par contre, si on élève la température au dessus de 24° par exemple, de très nombreux anticorps "froids" disparaissent, tandis que la sensibilité vis-à-vis d'anticorps "chauds" (anti-D par exemple) n'est guère changée.

Il semble que la température optimale se situe vers 18°.

Si la sensibilité, la polyvalence, l'appréciation quantitative, font de cette méthode, une technique de choix aussi bien pour la recherche, que pour les applications à la transfusion. Il reste à trouver une méthode complémentaire afin de dépister tous les anticorps.

Nous pensons, dans un avenir proche, pouvoir automatiser une technique équivalente au test de Coombs qui devrait permettre de combler les quelques lacunes de la méthode de P. Lalezari.

CHAPITRE IV

AUTRES APPLICATIONS A

L'IMMUNO - HEMATOLOGIE

23

1871

1

1872

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

Nous venons de voir des applications de ces techniques essentiellement orientées vers la transfusion.

D'autres méthodologies immuno-hématologiques sont automatisables :

LA REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT :

Cette fixation témoin d'une réaction antigène anticorps peut facilement être mise en évidence sur l'Auto Analyzer - (67 - 68 - 69 - 70 - 71 - 72 - 73)

La marche à suivre est identique à celle des techniques manuelles :

1° Dosage du complément

2° Application à la réaction voulue :

La sérologie de la Syphilis a bénéficié en premier lieu de ces techniques. Il est maintenant possible d'examiner 70 sérums par heure, par une méthode semi-automatique.

- la quantité de sérum et d'antigène (Kolmer ou Reiter) doit être définie manuellement et mis à incuber sur le distributeur d'échantillon. La suite de l'analyse est seule automatique.

La précision, la sensibilité, la reproductibilité de la méthode semblent au mieux identiques aux technique habituelles, surtout en ce qui concerne le dosage du C₃.

Floculation :

Dans le même but des techniques de floculation sur Auto Analyzer ont été mises au point.

L'antigène syphilitique est alors fixé sur des particules de charbons de bois. En cas de réaction positive, il y a agglutination de ces particules. Cette technique pourrait d'ailleurs être utilisée en parallèle avec le groupage sanguin ABO, à la cadence de 120 à l'heure.

Mais il ne semble pas que la sensibilité de la technique soit très satisfaisante ; par rapport aux tests de floculations classiques (Kline ou VDRL)

Dépistage des anticorps anti Gm

- Cette étude peut être effectuée sur l'Auto Analyzer. Il suffit de disposer d'hématies sensibilisées par un anti D (6) passant en continu dans un circuit d'hémagglutination.

- Les sérums sont injectés dans le circuit de manière séquentielle, et entraînent une agglutination s'ils contiennent un facteur anti Gm.

Dépistage et identification d'allo anticorps antiplaquettes

par déviation du C'

L'identification des facteur G_n

portés par les immunoglobulines G, fait appel à une technique inverse d'inhibition d'agglutination.

Mais là encore, la sensibilité et l'économie de réactifs ne sont pas supérieurs aux méthodes classiques.

Essai de détermination quantitative des antigènes de groupes sanguins

A, B, H, I, i.

Ce problème est actuellement à l'étude et concerne la détermination quantitative des antigènes A, B, H, I, i du globule rouge. Les résultats seront comparés à ceux obtenus par des méthodes automatiques utilisant les compteurs de particules (COULTER)

De plus cette étude est poursuivie dans le but de déterminer des variations quantitatives de ces antigènes au cours de différentes hémopathies.

Au cas où ces techniques s'avèreraient satisfaisantes nous comptons les étendre à d'autres systèmes de groupes (P - Rh par exemple)

Enfin, il n'est pas impossible d'envisager l'application à d'autres techniques immunologiques, comme l'Hémoagglutination passive, en employant des techniques dérivées de celles de P. LALEZARI.

CONCLUSION

Au terme de cette étude, nous pouvons concevoir, l'intérêt de ces nouvelles méthodologies en Immuno-Hématologie.

I° SUR LE PLAN TRANSFUSIONNEL.

De telles méthodes, ont permis d'augmenter le nombre, la précision, la reproductibilité des examens effectués

La sécurité des transfusions est ainsi accrue et ceci est d'autant plus important dans un centre de Transfusion où le nombre des examens sera toujours important. De plus, une telle organisation devrait permettre de régler les problèmes relatifs à la constitution de réserve de flacons de sang sélectionné, que doit posséder tout Centre de Transfusion. Ces flacons sont destinés à être transfusés à des malades présentant un allo-anticorp naturel ou d'immunisation. C'est ainsi, qu'il nous paraît nécessaire de posséder en permanence une réserve de flacons ne portant pas les antigènes correspondants aux anticorps les plus souvent rencontrés :

- $\bar{c}\bar{c}ddee$, Kell négatif
- CCDee, Kell négatif
- Le (a-b-)
- P₂

II

- Jk (a-)
- Fy (a-)
- ss, Ss, Kk, Ll
- Lu (a-)
- CcDDE

Ceci est encore plus appréciable en ce qui concerne l'approvisionnement des réserves de sang rare, qui ne peuvent se concevoir que sur un plan national ou international.

S'il a fallu tester 20.000 donneurs afin de trouver un seul sujet qui ne possède pas sur ses globules rouges l'antigène Kp^b , il est évident qu'une telle étude a grandement bénéficié de l'automatisation de la méthode. Non seulement parce qu'elle a permis une économie importante de temps et de personnel, mais aussi de réactif, puisque par des méthodes manuelles classiques nous n'aurions pu tester plus de 2.500 personnes, avec la même quantité de réactif. Le problème pourrait se résoudre de la même manière pour la recherche des flacons de sang "rare" (2) :

hh, Dash, pp, pK, Luke (-), S (-) s (-), KK, Kp^b (-), K_o , Vel(-), I(-), Lam(-), Sm(-), dont la fréquence est toujours inférieure à 1/1000.

Aussi, intéressant nous apparaît l'application au dépistage et à l'identification des anticorps anti-érythrocytes. En effet, chez les malades destinés à recevoir des transfusions, et avant celles-ci, deux solutions sont possibles, afin de dépister chez eux un éventuel allo-anticorps naturel ou d'immunisation (par grossesse par exemple) qui pourrait provoquer un accident immunologique de transfusion :

- soit ce qui est la règle dans de nombreux pays Anglo-Saxons, de pratiquer une épreuve de compatibilité entre le sérum du receveur et les flacons de sang destiné à lui être transfusés.

- soit de pratiquer chez lui avant toute transfusion une recherche d'agglutinines irrégulières, cherchant à mettre en évidence les anticorps les plus fréquemment rencontrés :

- anti-D, E, F, $\bar{C}$, C
- les anti Lewis'
- anti P₁

Du fait de l'organisation transfusionnelle Française, cette deuxième solution est choisie. A savoir, que chaque fois qu'un groupe est demandé en vue de transfusion, il est pratiqué un dépistage d'anticorps, et ceci de manière automatique. Nous avons cependant conservé un contrôle manuel en pratiquant parallèlement un test de Coombs, avec une antiglobuline à prédominance anti C', car nous avons vu que certains anti Lewis n'étaient pas détectés par cette méthode. L'automatisation de ce test de Coombs est d'ailleurs à l'étude.

Ce dépistage, lorsqu'il est positif, débouche sur l'identification automatique de la spécificité de l'anticorps.

Ce qui est réalisable pour les malades devant être transfusés, doit le devenir pour les donneurs, et entraîner aussi un dépistage et une identification d'anticorps chez les donneurs réguliers :

IV

- non seulement en vue de les écarter de certains usages transfusionnels (7) :
- Exanguino-transfusion du nouveau-né
- C.E.C
- Exanguino-transfusion de l'adulte
- mais aussi en vue de déceler chez eux d'éventuels allo-anticorps pouvant servir de réactifs :
- anti P_1 , anti Lewis, anti M, etc...

II° EN DEHORS DE LA TRANSFUSION

Des problèmes majeurs peuvent bénéficier de l'apport des techniques automatiques :

1° en Immuno-Génétique

En donnant la possibilité de tester de grands ensembles de population, qui peuvent seuls, permettent des calculs statistiques de fréquence correcte :

- Fréquence de l'antigène Radin, d'autres antigènes privés (Mg, Mh, Mt, Mi^a) etc...

De plus, on conçoit que le dépistage de sujets exceptionnels soit par la qualité de l'antigène (A faibles, B faibles), soit par l'absence d'un antigène donné (Bombay, Dash, K_o, I -) est particulièrement intéressante pour l'étude du fonctionnement génétique de ces locus.

2° En Immuno-Pathologie

C'est à partir de problèmes transfusionnels étudiés, que nous avons pu mettre au point une détermination quantitative des antigènes de groupes sanguins A, B, H, I, i. L'étude en est actuellement faite au cours de différentes hémopathies (12.54)

De même, il est possible de rechercher au cours de certaines affections auto-immunes (Anémies Hémolytiques à Auto-Anticorps) la présence d'anticorps anti-érythrocytes dirigés contre des antigènes de faible fréquence.

PERSPECTIVES D'AVENIR

Elles sont à considérer, car un reproche majeur est à faire à ces méthodes : le fait qu'elles n'apportent pas une automatisation complète qui permettrait

- d'une part : la reconnaissance formelle de l'échantillon et du résultat.

- d'autre part : l'interprétation automatique du résultat.

Un appareillage de ce type est actuellement en expérimentation (Groupamatic du Dr MATTE. Centre National de Transfusion Sanguine Paris.), qui permettra la lecture directe de l'agglutination par l'appareil, son interprétation et l'inscription du résultat par une imprimante (29).

On peut alors concevoir, pour le groupage sanguin, deux systèmes automatiques différents, aboutissant, en cas de résultats identiques, à l'établissement direct d'une carte de groupe sanguin.

De plus, à ce moment là, deviendrait possible la connexion directe de ces machines avec un ordinateur, permettant la création d'un fichier automatiquement alimenté (18).

Ce fichier, pourrait servir aussi bien à inventorier les donneurs de sang et les malades, à créer des listes de donneurs sélectionnés en vue de besoins

particuliers, mais aussi être utilisé dans un but de recherche et d'expérimentation en biologie humaine.

On conçoit alors que l'automatisation des techniques d'Immuno-Hématologie appliquée à la transfusion, ne peut s'envisager seule, mais qu'elle débouche sur une organisation complexe allant de la possibilité de congeler des flacons de sang sélectionnés ou rares, à l'utilisation de l'informatique qui s'avère au mieux capable de rentabiliser une telle organisation (10.11).

Il serait souhaitable, de pouvoir connecter directement l'interprétation des résultats, à des programmes établis sur ordinateur.

Ceci, est d'ailleurs réalisé en partie en ce qui concerne les transplantations d'organes, afin de compatibiliser le plus rapidement et le plus complètement possible donneurs et receveurs.

Quand on voit la masse d'informations potentielles que représente le passage quotidien de plusieurs centaines de donneurs sains et de malades, dans un Centre de Transfusion d'une certaine importance, on ne peut que souhaiter l'application rapide de méthodologies automatiques.

VU, LE PRESIDENT DE THESE

VU, LE DOYEN DE LA FACULTE

M. LE PROFESSEUR R. A N D R E

M. LE PROFESSEUR G. B R O U E T

VU, ET PERMIS D'IMPRIMER

LE RECTEUR DE L'ACADEMIE DE PARIS

M. R. MALLET

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLEN, F.H. Jr, ROSENFELD, R.E. and ADEBAHR, M.E.
Kidd and Duffy Blood Typing without Coombs Serum,
Adaptation of the Auto Analyser Hemagglutination
system ; Vox Sanguinis, 3 : 693-706 (1963)
2. ALLEN, F.H. Jr, and ALTER A.A.
The Auto Analyser in the Search for Rare Blood Donors,
Technicon Symp. 1966, Automation in Anal. Chem.,
p. 126-128 (1967)
3. ANDRE R., SALMON Ch., MALASSENET R. et PHILIPPON J.
Accidents de transfusion et iso-immunisations foeto-
maternelles dus au système de groupe sanguin Kell-Cellano
(Données étiologiques et sérologiques. Conclusions pra-
tiques). Sem. Hop. Paris, 1954, 30 : 3703
4. ANDRE R., SALMON Ch. et MALASSENET R.
A propos de trois exemples d'anticorps anti-Jk^a
acquis par transfusions, observés en association avec
des anticorps anti-Fy^a, S, c, E. Notes cliniques, séro-
logiques et anthropologiques. Rev. Hémat., 1956, 11 : 495
5. ANDRE R., DREYFUS B. et SALMON Ch.
Les accidents d'iso-immunisation transfusionnelle en
pratique chirurgicale. Clermont Médical, 1958, 32 : 103
6. ANDRE R., DREYFUS B. et SALMON Ch.
Etude statistique des iso-immunisations anti-érythrocytes
anti-leucocytes et anti-plaquettes observées chez 522
malades polytransfusés. In : Proc. 7th. Congr. Intern.
Soc. Blood Transfusion,ROME 1958 Edit : Karger (Basel,
New-York), 1959 : 363
7. ANDRE R. et SALMON Ch.
Note sur l'organisation des contrôles de compatibilité
avant les interventions de chirurgie cardiaque avec
circulation extracorporelle. 3e Congr. National de
Transfusion Sanguine, LYON 1960, : 225
8. ATCHLEY, W.A., BHAGAVAN, N.V. and MASUREDIS S.P.
Influence of ionic strength on the reaction between
anti-D and D positive red cells J. Immun. 93 : 701, 1964
9. BELLCHAMBERS L.A., RINSLER F.G., RIGBY A.G.
Computer-assisted method for compiling a blood-group
register. J.Clin.Path., 1969 22/2 : 229-232

10. BRINKHOUS, K.M.
Use of the computer in inventory control in the Blood Bank. Proc. of the 11th cong. of the Inter. Soc. of Blood Transfusion, (Sydney 1966)
11. CAMP, R.R.Jr and SHIELDS, C.E.
Screening Procedures Employing Semi-automated and Fully Automated Technics, Proc. of the 11th cong. of the Int. Soc. of Blood Transfusion, (Sydney 1966)
12. DREYFUS, B., ROCHANT, H., SALMON, Ch., BOIVIN, P, SULTAN, C., MANNONI, P, GALAND, C. et CARTRON, J.P.
Anémies réfractaires, états préleucémiques et anomalies enzymatiques multiples, C. R. Acad. Scie. Paris, Série I 266, 1627, 1968
13. DUCOS, J., MARTY, Y.
Intérêt et résultats de la recherche systématique des anticorps irréguliers à l'occasion de toute détermination de groupe sanguin. Transfusion, 1964, 2, 4, 357
14. DUCROS, M.J.F.
Large Scale Evaluation of Rapid Automatic Qualitative Blood Typing, Proc. 11th Cong. Int. Soc. Blood Transf., Sydney 1966, Bibl. Haemt. N° 29, Part 3 p. 947-957 (Karger, Basel & New-York 1968)
15. HUGHES-JONES, N.C., GARDNER B., and TELFORD, R.
The effect of pH and ionic strength on the reaction between anti-D and erythrocytes. Immunology 7 : 72, 1964.
16. IRVINE, W.J. and MARWICK, K.J.G.
The Detection of Gastric Parietal Cell Antibodies in Serum by the Automated Complement Fixation Technique, Technicon Symp. 1967, Automation in Anal. Chem., Vol. II, Mediad Inc., N. Y. C. (In print)
17. JANDL, J.H., SIMMONS, R.L.
The Agglutination and Sensitization of Red Cells by Metallic Cations : Interactions between Multivalent Metals and the Red Cell Membrane, Brit. Journal of Haematology, 3 : 19, 1957
18. KEMPF, B.
Tous les donneurs de France dans un ordinateur : Horizon 90 ou réalité 70 ?
Transfusion (Paris) 1967, 10, 1, 59-62
19. KLIMAN, A. and SMITH, E.P.
Large-Scale Routine Automatic Blood Typing, Technicon Symp. 1966, Automation in Anal. Chem., Bol. I, Mediad Inc., N. Y. C., p. 106-111 (1967)
20. LALEZARI, P., SPAET, T.H.
Antiheparin and Hemagglutinating Activities of Polybrène J. of Lab. and Clin. Med. Saint-Louis, 57, 6, p. 368-373 (1961)

21. LALEZARI, P.
A polybrene method for the detection of red cell antibodies. Fed. Proc. 26 : 756, 1967
22. LALEZARI, P.
A new method for the detection of red cell antibodies. In Automation in Analytical Chemistry. Technicon Symposia 1967, p. 169-172
23. LALEZARI, P.
A new red cell method for the simultaneous detection of hemagglutinins and leukoagglutinin. In Histocompatibility Testing 1967, Copenhagen, Munksgaard, 1967, p. 419
24. LALEZARI, P.
A new method for Detection of Red Blood Cell Antibodies Transfusion 1968, 8.6, p. 372-386
25. LOCKYER, W.J. and COTTON, R.
Introduction of Automated Blood Grouping to a Large British Regional Transfusion Centre, Technicon Symp. 1967, Automation in Anal. Chem., Vol. II, Mediad Inc., N. Y. C. (In print)
26. Mc NEIL, C., HELMICK, W.M. and FERRARI, A.
A Preliminary Investigation into Automatic Blood Grouping, Vox Sanguinis, 3 : 235-241 (1963)
27. MARSH, W.L., NICHOLS, M. and JENKINS, W.J.
Automated Detection of Blood Group Antibodies, J. med. Lab. Techn., 1968, 25/4 : 335-42 (B. Sign. 30-340-24521, 69)
28. MARSH, W.L.
An Evaluation of Automated Antibody Detection, Technicon Symp. 1967, Automation in Anal. Chem., Vol. II, Mediad Inc., N. Y. C.
29. MATTE, Cl.
Détermination automatique des groupes sanguins - réalisation d'un appareil expérimental, Rev. Fne de Transfusion, XII, 2, 1969
30. MILNER, L.V.
Bromelin Treatment of Red Blood Cells, Transfusion 9, 1, p. 39-43 (1968)
31. MOORE, B.P.L.
Automation in the blood transfusion laboratory :
I. Antibody detection and quantitation in the Technicon auto-analyzer.
Canad. Med. Ass. J., 1969, 100/3 : 381 (Cur. Cont., 1969 12/11 : 125)

32. MORTON, J.A.
Screening for Blood Group Antibodies with the Auto Analyser, Abstract, Intern. Technicon Symp., Automation in Anal. Chem., Technicon GmbH, Frankfurt, Germany, p. 962 (1965)
33. MORTON, J.A. and PICKLES, M.M.
Screening for Blood Group Antibodies with the Auto Analyser, Technicon Symp. 1965, Automation in Anal. Chem., Mediad Inc., N.Y.C., p. 535-538 (1966)
34. MORTON, N.E., YASUDA, N. and FU, L.
A special Theory of Hemagglutination, Vox Sang., 11 : 12-20 (1966)
35. NEITZER, G.M., GORRIEN, M.J., ZUELZER, W.W.
Experience in blood grouping tests with automated technics. Abstr. Papers 21 st. Ann. Meet. AABB, Oct. 1963 (Transfusion, 1963, 3/5 : 330)
36. NELSON, M.G.
Automation in the laboratory
J. Clin. Path., 1969 22/1 : 1 (Cur. Cont. 1969 12/14 : 154)
37. PANASEWICZ, J.
Application of Automatic Laboratory Analysers in the Field of Haematology and Blood Transfusion, Proc. XI-th Congr. Int. Soc. Blood Transf., Sydney, Aust., Aug. 1966, p. 1-4
38. POLLACK, W.
Some physicochemical aspects of hemagglutination.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 127 : 392, 1965
39. POLLACK, W., HAGER, H.J., RECKEL, R., TOREN, D.A., and SINGER, H.F.
A study of the forces involved in the second stage of hemagglutination. Transfusion 5 : 153, 1965
40. ROSENFELD, R.E., SZYMANSKI, I.O., HABER, G.V. and KOCHWA, S.
Automated Methods for the Detection and Measurement of Hemagglutination, Technicon Intern. Symp., Automation in Anal. Chem., N. Y. C. (36). Reprinted by Technicon Ardsley, N. Y. (1964)
41. ROSENFELD, R.E., SZYMANSKI, I.O. and KOCHWA, S.
Immunochemical Studies of the Rh System : III, Quantitative Hemagglutination that is Relatively Independent of Source of Rh
Antigens and Antibodies, Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., 29 : 427-434 (1964)

42. ROSENFELD, R.E., SZYMANSKI, I.O., and KOCHWA, S.
Heterogeneity of Rh Antigens and Antibodies Determined
by Quantitative Hemagglutination at Low Antibody Con-
centrations, Abstract, Fed. Proc., 23 (2) : 141 (1964)
43. ROSENFELDS, R.E., SZYMANSKI, I.O. and SPITZ, C.
Cold Kinetics of the Donath-Landsteiner Reaction,
Abstract, Technicon Symp. 1965, Automation in Anal.
Chem., Mediad Inc., N. Y. C., p. 502 (1966)
44. ROSENFELDS, R.E. and HABER, G.V.
Detection and Measurement of Homologous Human Hemag-
glutinins, Technicon Symp. 1965, Automation in Anal.
Chem., Mediad Inc., N. Y. C., p. 503-506 (1966)
45. ROSENFELD, R.
Automated Serological Techniques -(a) Blood Typing
(b) Quantitation, Proc. 1963 Technicon Symp., Auto-
mated Anal. Chem., Technicon Instrs. Co., Ltd,
London, p. 69-81 (1964)
46. ROSENFELD, R.E., SPITZ, C., BAR-SHANY, S., PERMOAD, P. and
DUCROS, M.
Low Ionic Concentration to augment Hemagglutination
for the detection and the measurement of Serological
Incompatibility, Symp. 1967, p. 173-175
47. RUBINI, J.V., STOHMANN, M.A. and RASMUSSEN, A.F. Jr
Agglutination of red cells by synthetic lysine poly-
pytides. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 76 : 659, 1961
48. SALMON, Ch.
Remarques techniques sur les conditions de dépistages
et d'identification des iso-anticorps anti-érythrocytes
chez les malades polytransfusés, III Congrès Nat.
Transfusion Sanguine LYON 1960, 279
49. SALMON, Ch.
La spécificité des iso et auto-anticorps anti-éry-
throcytes. in "Actualités en Transfusion Sanguine
p. 107-130, Masson et Cie 1967
50. SALMON, Ch., ANDRE, R.
Contrôles immunologiques relatifs aux transfusions
extra-corporelles.
Transfusion (Paris) 1963, 6, 4, 465-470
51. SALMON, Ch.
Recherche et dosage des agglutines irrégulières.
Pathol. et Biol., 1957, 5 : 61

52. SALMON, Ch.
Anticorps acquis par transfusions sanguines.
Presse Méd., 1956, 64 : 1975
53. SALMON, Ch.
Aspects cliniques et sérologiques de l'iso-immunisation
anti-érythrocytes par transfusions.
Vos Sang 1959, 4 : 40
54. SALMON, Ch., MANNONI, P., et SEGER, Jeanine
Aspects nouveaux des variations des antigènes de groupes
sanguins, Rev. Fse de Transfusion, XII, 2, 1969
55. SCOTT, G.L., PRIEST, G.J.
Experience with automations equipment for routine
blood group serology, Proc. 11th Cong. Int. Soc.
Haematology and International Committee of Standardi-
sation in Haematology, Brit. Journal of Haematology,
40-49
56. SOLOMON, J.M.
Behavior of incomplete antibodies in quantitative
hemagglutination reactions. Transfusion 4 : 101, 1964
57. STODIEVIC, C.
Auto Analyzer et Techniques d'Hemoagglutination,
Troisième Symp., Inter., Paris (#F-70). Reprinted
by Compagnie Technicon, DORCOT, France (1964)
58. STREIFF, F., PETERS, A., GEBETET, B., VIGNERON, C.
La sécurité transfusionnelle.
Bull. Ass. Dir. Microb. Fac. Pharm. Nancy, 1966,
193 : 57-72 (in Bull. Sign. 14, 1967, 23/2 : 243)
Revue des différents systèmes de groupe érythrocytaire
des différents anticorps responsables des accidents.
2 épreuves de compatibilité.
59. STURGEON, P., CEDERGREN, B. and Mc QUISTON, D.
Automation of Routine Blood Typing Procedures,
Vos Sanguinis, 3 : 433-451 (1963)
60. STURGEON, P. and Mc QUISTON, D.
The Status of Routine Blood Typing with the Auto-
Analyseur, Amer. J. Clin. Path., 43 (5) : 454-463
(1965)
61. STURGEON, P., DUCROS, M., Mc QUISTON, D., and SMYTHE, W.
Multichannel High-Speed Fully Automated Filter Paper
Unit for Routine Blood Typing, Technicon Symp. 1965,
Automation in anal. chem., Mediad Inc., N. Y. C.,
p. 515-524

62. STURGEON, P. and Mc LUITO, D.
Fully Automated System for the Quantitation of A,
B and H substances, Technicon Symp. 1966, Automation
in Anal. Chem., Vol. I, Mediad Inc., N. Y. C., p. 122-
125 (1967)
63. STURGEON, P.
The Future of Automation in Haematology, Brit. J.
Haemat., 13 (suppl.) : 3-7 (1967)
64. TASWELL, H.F. and GRIFA, J.H.
Evaluation of Single-Channel Haemagglutination Auto
Analyzer for Antibody Screening and Quantitation,
Technicon Symp. 1967, Automation in Anal. Chem.,
Vol. I, Mediad Inc., N. Y. C. (In print) p. 165-168
65. TOBIAS, K.I. and HOXWORTH, P.I.
Practical application of low ionic strength mannitol-
saline in the antiglobulin test. Transfusion 6 :
526, 1966
66. TOVEY, G.H.
Use of Auto Analyzer in Ante-Natal Prediction of
Severity in Rh Haemolytic Disease, Technicon Symp.
1967, Automation in Anal. Chem., Vol. II, Mediad Inc.,
N. Y. C. (In print)
67. UNGER, P., and RAIGREN, O.
Automated Techniques in Blood Group Serology,
Proc. of the 11th Cong. of the Int. Soc. of Blood
Transfusion, Sydney 1966
68. VARGUES, R. and AYEVA, R.
Courbes Cinétiques Automatiques (Auto Analyseur Tech-
nicon) de la Fixation du Complément sur Divers Com-
plexes "Antigènes-Anticorps", Compt. Rend. séances
Soc. Biol., 153 (6) : 1401-1404 (1964)
69. VARGUES, R.
Automatic Determinations of Human Complement,
Technicon Symp. 1967. Automation in Anal. Chem.,
Vol. II, Mediad Inc. N.Y.C.
70. VARGUES, R. and AYEVA, R.
Utilisation de l'Auto Analyseur Technicon dans
l'Etude Cinétique de la Fixation du Complément Immu-
nologique (C'), Compt. Rend. Séances Soc. Biol., 157
(4) : 372-376 (1963)

71. VARGUES, R., STUDIEVIC, C. and AUDURIER, A.
Le Dosage des Anticorps Fixant le Complément. Comparaison entre les Techniques Manuelles et les Techniques Automatiques,
Ann. Inst. Pasteur, 110 (3) : 233-243 (1966)
72. VARGUES, R., STUDIEVIC, C., MORAUD, B. and GONTHIER, F.
Effet de la Température sur la Vitesse de la Réaction de Fixation du Complément, Ann. Inst. Pasteur, 109 : 39-47 (1965)
73. VARGUES, R., STUDIEVIC, C. and RIPAULT, C.
L'automatisation de la Réaction de Bordet-Wassermann, Ann. Biol. Clin., 23 (5-6) : 623-640 (1965)

